台灣農業研究
JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
Vol.65 No.1 2016

Research Articles

1 Redescription of *Monolepta sexlineata* Chûjô, 1938 (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae)
Chi-Feng Lee

8 Response of Rice Varieties ‘LTH’ Monogenic Lines and ‘CO 39’ Near-Isogenic Lines to Rice Blast
Dah-Jing Liao, Lung-Che Chen, Chih-Wen Wu, and Chia-Lin Chung

18 Development of Detection and Quantification Methods for Transgenic Potato Using Multiplex PCR and Plasmidic Reference Material
Yuan-Kai Tu, Yu-Wei Feng, Min-Tze Wu, Shi-Yu Wang, Shu Chen, and Han-Wei Chen

31 Study on Development of *Japonica* Breeding Lines Introgressed High Grain Number Gene through Marker-Assisted Backcross Approach
Ming-Hsin Lai, Charng-Pei Li, Woei-Shyuan Jwo, Hsin-Mu Yen, Kae-Kang Hwu, and Dong-Hong Wu

45 The Study of Physiological Characteristics and Control of *Phomopsis destruens* Causing Foot Rot of Sweet Potato
Chiao-Wen Huang, Hong-Ren Yang, Ching-Yi Lin, Sui-Li Hsu, Su-Yu Lai, and Hui-Fang Ni

54 Study on the Resistance eQTLs in the Rice Bacterial Blight Resistant Mutant, SA0423
Da-Gin Lin, Yu-Ling Lin, Chiao-Yi Huang, Hsin-Yi Tseng, Wen-Bin Tseng, Chun-Wei Chen, and Chang-Sheng Wang

70 Output Analysis of the Research and Development Achievements and Their Value-Added Applications: A Case Study of Taiwan Agricultural Research Institute
Yi-Ying Lee, Wei-Chun Chen, and Shen-Chen Yang

84 Bioassay of the Biotypes of Brown Planthopper in Taiwan
Shou-Horng Huang, Ching-Huan Cheng, Chiou-Nan Chen, and Wen-Jer Wu

92 Epidemical Study of *Fusarium fujikuroi* by Rice Straws
Su-Chen Lin, Chun-Yu Zheng, Chao-Yi Wang, Zong-Zhe Wu, and Chi-Yu Chen

Short Communication

103 Identification of *Wasabi mottle virus* Infecting Wasabi in Taiwan
Ting-Chin Deng, Chin-Hui Tsai, and Fang-Yu Ning

ISSN 0022-4847
9 770022 484003

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

台灣農業研究
JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
Vol.65 No.1 2016

ISSN 0022-4847
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究
JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
Vol.65 No.1 2016

研究報告

1 六線長腳螢金花的分類回顧（鞘翅目：金花蟲科：螢金花蟲亞科）
李奇峰

8 水稻‘LTH’單基因系與‘CO 39’近同源系對台灣稻熱病菌之反應
廖大經、陳隆澤、吳志文、鍾嘉綾

18 利用質體參考物質以及多重聚合酶連鎖反應建構基改馬鈴薯之檢測與定量方法
杜元凱、馮昱維、吳明哲、王熙宇、陳述、陳涵葳

31 應用分子輔助回交選育稻多粒數品系之探討
賴明信、李長沛、卓緯玄、顏信沐、胡凱康、吳東鴻

45 甘藷基腐病菌*Phomopsis destruens*生理特性及防治技術研究
黃巧雯、楊宏仁、林靜宜、許淑麗、賴素玉、倪蕙芳

54 水稻抗白葉枯病突變體SA0423抗性表現數量性狀基因座 (eQTL) 之研究
林大鈞、林玉鈴、黃巧宜、曾馨儀、曾文彬、陳純葳、王強生

70 研發成果之產出分析與加值應用：農業試驗所之案例
李宜映、陳韋竣、楊舜臣

84 台灣水稻褐飛蝨生物小種之調查
黃守宏、鄭清煥、陳秋男、吳文哲

92 稻稈傳播水稻徒長病可能性之探討
林素禎、鄭春玉、王朝儀、吳宗哲、陳啟予

研究簡報

103 台灣山葵上發生的山葵斑駁病毒之鑑定
鄧汀欽、蔡錦慧、寧方俞

行政院農業委員會農業試驗所出版

《台灣農業研究》編審會

總編輯

楊純明／農業試驗所作物組

領域主編（按筆劃序）

王強生／中興大學農藝系
申　雍／中興大學土壤環境科學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
呂秀英／苗栗區農業改良場
柯文雄／中興大學植物病理學系
侯豐男／中興大學昆蟲學系
郭鴻裕／農業試驗所農業化學組
高景輝／台灣大學農藝學系
陳世銘／台灣大學生物產業機電工程系
陳吉仲／中興大學應用經濟系
陳宗禮／中興大學農藝系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
陳福旗／屏東科技大學農園生產系
黃振文／中興大學植物病理學系
黃肇家／農業試驗所作物組
黃鵬林／台灣大學園藝暨景觀學系
鄔宏潘／中央研究院植物暨微生物學研究所
曾夢蛟／中興大學園藝系
蔡致榮／農業試驗所
蔡新聲／朝陽科技大學生化科技研究所
歐錫坤／農業試驗所作物組
簡立賢／中興大學應用經濟系
蘇正德／東海大學食品科學系

編輯助理

王立蓉／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室
吳宜晏／農業試驗所技術服務組
陳相君／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室

台灣農業研究

第六十五卷　第一期　　　　中華民國一〇五年三月三十日

出版者	行政院農業委員會農業試驗所
發行人	陳駿季
總編輯	楊純明
地址	41362 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址	http://www.tari.gov.tw
電話	(04)2331-7236
E-mail	jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統	http://aspers.airiti.com/JTAR
編印	Airiti Press Inc.
地址	23452 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話	(02)2926-6006
E-mail	press@airiti.com
定價	新台幣一七五元
展售門市	1. 國家書店 / 10485 台北市松江路 209 號 1 樓 / 電話 : (02) 2518-0207 國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw 2. 五南文化廣場 / 40042 台中市中山路 6 號 / 電話 : (04) 2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 65(1):1–7 (2016)
DOI: 10.6156/JTAR/2016.06501.01

Research Article

Redescription of *Monolepta sexlineata* Chûjô, 1938 (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae)

Chi-Feng Lee[1,*]

Abstract

Lee, C. F. 2016. Redescription of *Monolepta sexlineata* Chûjô, 1938 (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae). J. Taiwan Agric. Res. 65(1):1–7.

The taxonomic status of *Monolepta sexlineata* Chûjô, 1938 is evaluated by examining type specimens of all synonyms and specimens collected from various localities. Lectotypes are designated for *Monolepta duvivieri* Jacoby, 1904 and *M. sexlineata* Chûjô, 1938. Diagnostic characters of both sexes are illustrated.

Key words: Leaf beetle, Taxonomy, Endophallic sclerite.

INTRODUCTION

The genus *Monolepta* Chevrolat, 1837 is the most speciose galerucine genus, with about 600 described nominal species (Wagner 2007). Most species have been described from tropical Africa, Asia, and Australia, and few also from the southeastern Palaearctic region, and from the Neotropics (Wilcox 1973). This genus can be diagnosed by two characters: the closed front coxal cavity and the first tarsomere I of hind legs longer than others combined. Kimoto & Takizawa (1997) reported 28 species from Taiwan. One new species, *M. tsoui*, was described by Lee (2009). Two more new species, *M. ongi* Lee and Staines, 2010 and *M. meihuai* Lee, Tian, and Staines, 2010 were described in the following year.

A few species are widespread and not restricted to Taiwan. Their taxonomic status has not been studied except for one species, *M. signata* (Olivier, 1808). Wagner & Bieneck (2012) studied types of its synonyms and confirmed a widespread distribution that ranges from southern China, Taiwan, and India to New Guinea, and, rarely, northern Australia.

The taxonomic history of *M. sexlineata* is complicated. Jacoby (1904) described *M. duvivieri* from India. However, it is a junior homonym of *Candezea duvivieri* Jacoby, 1897. Weise (1915) proposed a replacement name, *M. lineata* for *M. duvivieri* Jacoby, 1904, but it was still a junior homonym of a species described by Karsch (1882). Thus Wilcox (1973) proposed another replacement name, *M. madrasensis* for *M. lineata* Weise, 1915. Finally, Kimoto (1989) regarded *M. madrasensis* Wilcox, 1973 as a junior synonym of *M. sexlineata* Chûjô, 1938.

Monolepta sexlineata Chûjô, 1938 has been recorded from type localities in India and Taiwan and from mainland China by Gressitt & Kimoto (1963), Thailand, Cambodia, Laos, and Vietnam by Kimoto (1989), Sri Lanka by Mohamedsaid (1997), and Nepal by Kimoto & Takizawa (1983). To evaluate the taxonomic status of this species, types of both synonyms

Received: May 22, 2015; Accepted: June 16, 2015.
[*] Corresponding author, email: chifeng@tari.gov.tw
[1] Associate Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

were studied in addition to specimens collected from various countries.

MATERIALS AND METHODS

To prepare drawings of the adult reproductive systems, the abdomens of adults were separated and boiled in a 10% KOH solution, cleared in distilled water, and then covered by a cover glass on slide glass with glycerin for observation. Specimens were examined and drawings were made using a Leica M165 stereomicroscope. Microscopic slides were examined and illustrated using a Nikon ECLIPSE 50i microscope. Body parts were then stored in glycerin tubes with the dry mounted specimens.

Specimens available for study are deposited in the following collections: BMNH: The Natural History Museum, London, UK; EUMJ: Ehime University, Matsuyama, Japan; KMNH: Kitakyushu Museum of Natural History and Human History, Kitakyushu, Japan; SDEI: Senckenberg Deutsches Enomologisches Institut, Müncheberg, Germany; TARI: Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan.

Exact label data are cited for all type specimens; a double slash (//) divides the data on different labels and a single slash (/) divides the data in different rows. Other comments and remarks are indicated as follow: (p) preceding data are printed, (h) preceding data are handwritten, (w) white label, (b) blue label, (g) green label, and (r) red label.

RESULTS AND DISCUSSION

Monolepta sexlineata Chûjô

Monolepta duvivieri Jacoby, 1904: 404 (India; nec Jacoby, 1897).

Monolepta lineata Weise, 1915: 177 (replacement name for *Monolepta duvivieri* Jacoby, 1904; nec Karsch, 1882); Maulik, 1936: 398 (redescription); Hartmann & Medvedev, 2003: 169 (Nepal).

Monolepta madrasensis Wilcox, 1973: 562 (replacement name for *Monolepta lineata* Weise, 1915); Kimoto & Takizawa, 1983: 89 (Nepal); Kimoto, 1989: 150 (as synonym of *Monolepta sexlineata* Chûjô, 1938); Sprecher-Uebersax, 2000: 145 (Nepal).

Monolepta sexlineata Chûjô, 1938: 150 (Taiwan); Chûjô, 1962: 127 (redescription); Gressitt and Kimoto, 1963: 632 (China: Hainan, Guandong); Kimoto, 1989: 150 (Thailand, Cambodia, Laos, Vietnam); Yu *et al.*, 1996: 172 (China: Guanxi); Mohamedsaid, 1997: 6 (Sri Lanka); Medvedev, 1999: 183 (Nepal); Kimoto, 2003: 34 (Sri Lanka); Hartmann & Medvedev, 2003: 169 (Nepal).

Type Specimens Examined. *Monolepta duvivieri*: Lectotype ♀ (BMNH), here designated, labeled: "Nilgiri Hills [p, w] //Type [p, w; circle label with red border] // 912 [h, w; red letters] //*Monolepta*/*Duvivieri*/Jac. [h, b] // Jacoby Coll./1909 28a [p, w] //**OriGa**/Specimen ID: [p] /93 [h] /specimen data/documented [p] / 27.VIII2008 [h, w]". Paralectotype: 1♀ (BMNH): "Nilgiri Hills [p, w] //Type [p, r] // 912 [h, w; red letters] //*Monolepta*/*Duvivieri*/ Jac. [h, b] //Andrewes/Bequest/B.M. 1922-221. [h, w]".

Monolepta sexlineata: Lectotype ♂ (left elytron lost; TARI), here designated, labeled: "Tainan/Formosa/H. Sauter [p] IV.19 [h, w] // CO/Type [p, yellow letters, circle label with yellow border] //*Monolepta*/*sexlineata*/CHÛJÔ [h] /DET. M. CHUJO [p, w] //1379 [p, w]". Paralectoypes: 1♀ (SDEI): "Tainan/Formosa/ H. Sauter [p] IV.19 [h, w] //Syntypus [p, r] // *Monolepta*/*sexlineata*/CHÛJÔ [h] /DET. M. CHUJO [p, g] //DEI Müncheberg/Col – 05711 [p, g]"; 1♀ (TARI): "Anping/Formosa/H. Sauter Ɐ.1912 [p, w] //CO/Type [p, yellow letters, circle label with yellow border] //*Monolepta*/ *sexlineata*/CHÛJÔ [h] /DET. M. CHUJO [p, w] //1364 [p, w]"; 1♂ (SDEI): "Anping/Formosa/ H. Sauter Ɐ.1912 [p, w] // 7 IV. [p, w] // Syntypus [p, r] //*Monolepta*/*sexlineata*/CHÛJÔ [h]

/DET. M. CHUJO [p, g] //DEI Müncheberg/ Col – 05710 [p, g]".

Additional Specimens Examined. INDIA: Assam: 1♀, Kaziranga, 75 m, 7-9.V.1976, leg. Wittmer (KMNH); **LAOS:** 1♂, Muong Sing, NW of Luang Prabang, 650 m, 6-10.VI.1960, leg. L. W. Quate (KMNH); 1♂, Sedone Prov., Paksong, 18.V.1965, leg. P. D. Ashlock (KMNH); **SRI LANKA:** 1♂, Polonnaruwa, 10.III.1976, leg. Ziegler (KMNH); Kandy Dist.: 1♀, Kalgomuwa, 29.I.1974, leg. A. Otake (EUMJ); Matale Dist.: 2♀♀, Sigiriya, 19.IV.1975, leg. A. Otake (EUMJ); 2♂♂, same but with "10.V.1975" (EUMJ); **TAIWAN:** Pingtung: 1♂, Kenting, 15.V.2010, leg. C.-S. Chiu & Y.-C. Lan (TARI); 1♂, same locality, 14.IX.2011, leg. Y.-C. Lan & Y.-H. Peng (TARI); 1♀, Lanren River, 16.VI.2010, leg. Y.-C. Lan & Y.-H. Peng (TARI); 1♀, Longluan Lake, 26.IV.2011, leg. S.-Y. Lee (TARI); 2♂♂, 1♀, same but with "30.VI.2011" (TARI); Tainan: 2♂♂, Chiku, 20.IV.2010, leg. T.-H. Lin (TARI); Taipei: 5♂♂, 1♀, Kuantu, 17-18.IV.2013, leg. S.-F. Yu (TARI); **THAILAND:** 1♀, Chiang Mai, 9.VI.1965, leg. K. Morimoto (KMNH); 1♂, Fang Spa, 21.XI.1968, leg. K. Hatta (EUMJ).

Remarks. *Monolepta sexlineata* is characterized by its color pattern: the yellowish brown elytron with one longitudinal black stripe beginning behind the humerus and abbreviated apically, and the black suture and lateral margin (Fig. 1).

Males. Length 2.8–3.5 mm, width 1.3–1.6

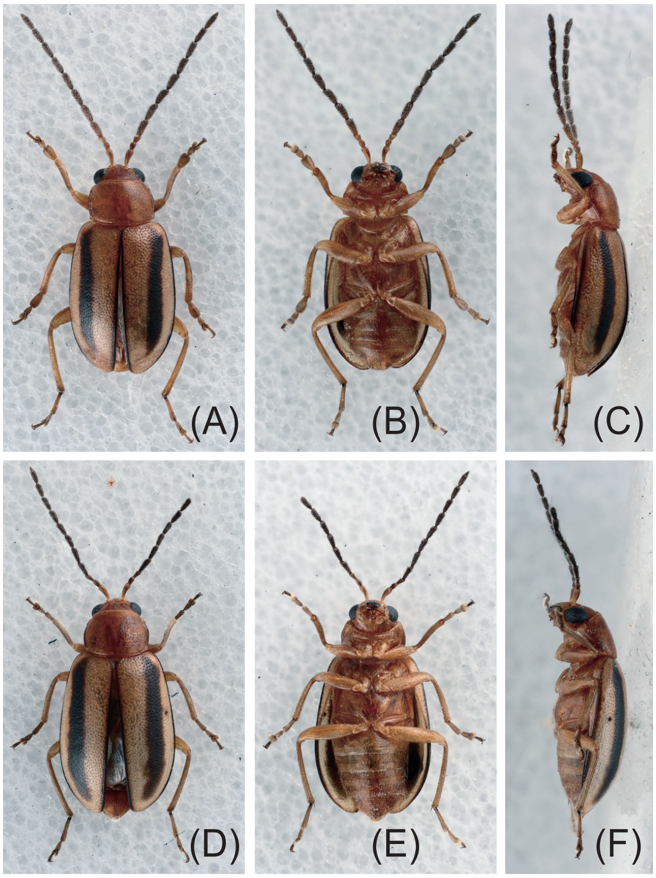


Fig. 1. Color habitus of *Monolepta sexlineata*. (A) Male, dorsal view; (B) Ditto, ventral view; (C) Ditto, lateral view; (D) Female, dorsal view; (E) Ditto, ventral view; and (F) Ditto, lateral view.

mm. Color yellowish brown (Figs. 1A–1C); antenna black but three basal tarsomeres paler, elytron with one wide, longitudinal black stripe extending from behind humerus and abbreviated at apical 1/4; lateral margins darkened but apically and basally abbreviated, suture black. Head smooth and without punctures. Antenna (Fig. 2A) filiform, about 0.85 times as long as body, ratio of length of antennomeres II to XI about 1.0 : 1.1 : 2.2 : 2.2 : 2.2 : 2.2 : 2.2 : 2.1 : 1.8 : 2.3; ratio of length to width from antennomere II to XI about 1.7 : 2.0 : 3.3 : 3.1 : 3.2 : 3.3 : 3.3 : 3.3 : 3.1 : 3.7. Pronotum rectangular; 1.38–1.44 times wider than long; lateral margins arcuate; disc evenly convex and with dense coarse punctures. Elytra elongate, 1.54–1.55 times longer than wide; parallel-sided; disc with dense and coarser punctures than pronotum. Front and middle tarsomeres I apically and asymmetrically swollen (Fig. 2G). Penis (Figs. 2C and 2D) extremely elongate, about 6.8 times longer

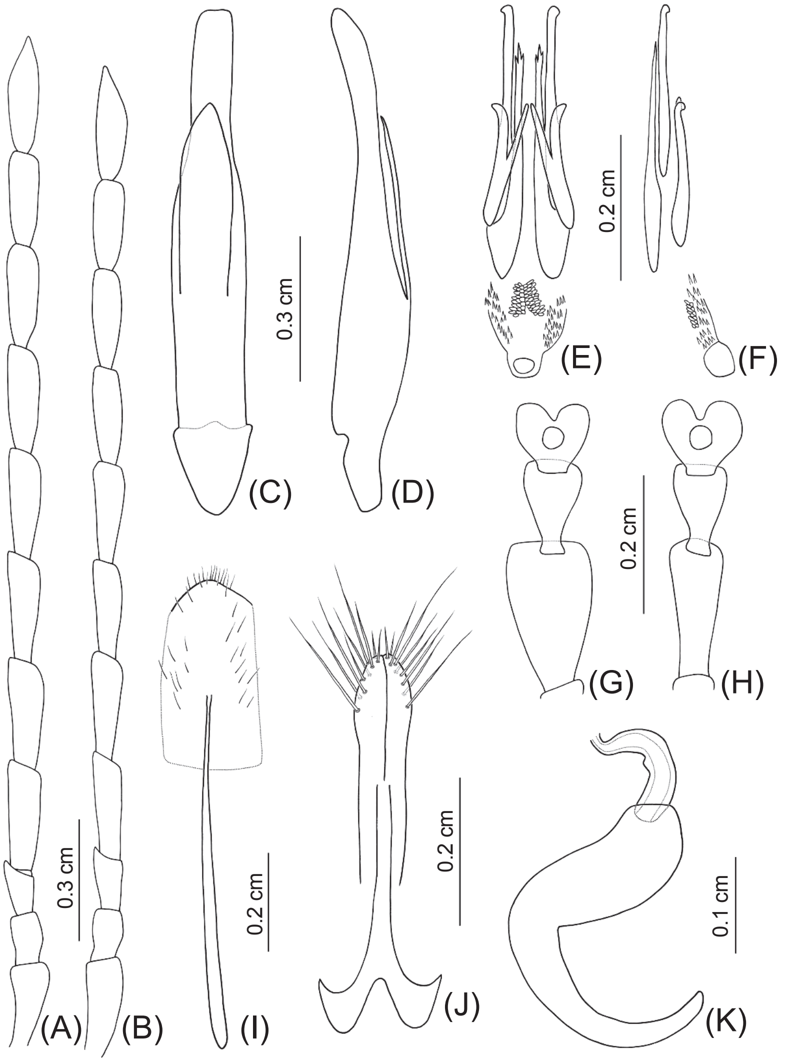


Fig. 2. Diagnostic characters of *Monolepta sexlineata*. (A) Antenna, male; (B) Antenna, female; (C) Penis, dorsal view; (D) Penis, lateral view; (E) Endophallic spiculae, ventral view; (F) Endophallic spiculae, lateral view; (G) Tarsi of front leg, male; (H) Tarsi of front leg, female; (I) Ventrite VIII, female; (J) Gonocoxae; and (K) Spermatheca.

than wide; parallel-sided, abruptly widened at basal 1/4, apex slightly concave; tectum elongate and with pointed apex; slightly curved at basal 1/4 in lateral view; internal sac with two pairs of median endophallic spiculae (Figs. 2E and 2F), one with apex recurved, the other with apex pointed and disc with several teeth; one pair of lateral endophallic spiculae deeply bifurcate, outer one with apex recurved; dense ventral endophallic spiculae surrounding base.

Females. Length 3.2–3.6 mm, width 1.6–1.7 mm. Similar to male (Figs. 1D–1F); antenna relatively shorter than male (Fig. 2B), about 0.71 times as long as body, ratio of length of antennomeres II to XI about 1.0 : 1.1 : 2.0 : 2.0 : 1.8 : 1.8 : 1.8 : 1.8 : 1.7 : 2.2; ratio of length to width from antennomere II to XI about 1.8 : 2.0 : 3.8 : 3.7 : 3.4 : 3.4 : 3.4 : 3.4 : 3.2 : 3.9. Front and middle tarsomeres I normal and not swollen (Fig. 2H). Gonocoxae (Fig. 2J) slender, tightly combined from apical 1/3 to near base, base well separated, tightly connect with each other from apical 1/3 to apex; each gonocoxa with nine setae from apical 1/6 to apex, apex rounded. Ventrite VIII (Fig. 2I) weakly sclerotized; apical margin widely rounded, with dense short setae at apex, and several long at sides, spiculum extremely elongate. Spermathecal receptaculum (Fig. 2K) swollen; pump extremely slender and curved; sclerotized spermathecal duct short and narrow.

Biological Notes. This species inhabits lowlands below 200 m elevation. Some individuals were collected using light traps. Some were observed feeding on flowers of *Youngia japonica* (Compositae) under laboratory conditions.

Distribution. Cambodia, China, India, Laos, Nepal, Sri Lanka, Taiwan, Thailand, Vietnam.

ACKNOWLEDGMENTS

I thank Michael Geiser (BMNH), Minoshima Yusuke (KMNH), Hiroyuki Yoshitomi (EUMJ), and Stephan Blank (SDEI) for loans of valuable specimens. I also thank members of Taiwan Chrysomelid Research Team for assisting in collecting materials, including Su-Fang Yu and Mei-Hua Tsou. I specially thank Ta-Hsiang Lee for taking photographs of specimens. I thank Chris Carlton for reading the draft and editing for English style.

REFERENCES

Chûjô, M. 1938. H. Sauter's formosa-collection: Subfamily Galerucinae (Coleoptera: Chrysomelidae). Arb. Morphol. Taxon. Entomol. 5:135–152.

Chûjô, M. 1962. A taxonomic study on the Chrysomelidae (Insecta: Coleoptera) from Formosa Part XI. Subfamily Galerucinae. Philipp. J. Sci. 91:1–239.

Gressitt, J. L. and S. Kimoto. 1963. The Chrysomelidae (Coleopt.) of China and Korea Part 2. Pac. Inst. Monogr. 1B:301–1026.

Hartmann, M. and L. N. Medvedev. 2003. To the knowledge of Nepalese Chrysomelidae (Coleoptera). Veröff. Naturkundemus. Erfurt 22:153–183.

Jacoby, M. 1897. Further contributions to the knowledge of the phytophagous Coleoptera of Africa, including Madagascar. Part I. Proc. Zool. Soc. London 1897:238–265.

Jacoby, M. 1904. Another contribution to the knowledge of Indian phytophagous Coleoptera. Ann. Soc. Entomol. Belg. 48:380–406.

Karsch, F. 1882. Verzeichniss der von Dr. Falkenstein in Westafrika (Chinchoxo) gesammelten Chrysomeliden, Endomychiden, Coccinelliden, und Anthrotribiden. Berlin. Entomol. Zts. 26:395–403.

Kimoto, S. 1989. Chrysomelidae (Coleoptera) of Thailand, Cambodia, Laos, and Vietnam. IV. Galerucinae. Esakia 27:1–241.

Kimoto, S. 2003. The Chrysomelidae (Insecta: Coleoptera) collected by Dr. Akio Otake, on the occasion of his entomological survey in Sri Lanka from 1973–1975. Bull. Kitakyushu Mus. Nat. Hist. Human Hist. Ser. A 1:23–43.

Kimoto, S. and H. Takizawa. 1983. Chrysomelidae beetles of Nepal, collected by the Himalaya Expedition 1979 of the National Science Museum Tokyo (Part 1). Bull. Nat. Mus. Sci. A (Zoology). 9:83–96.

Kimoto, S. and H. Takizawa. 1997. Leaf Beetles (Chrysomelidae) of Taiwan. Tokai University Press. Tokyo. 581 pp.

Lee, C. F. 2009. A taxonomic revision of *Monolepta pallidula* species group in Taiwan (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae). Zootaxa 2170:15–27.

Lee, C. F. and C. L. Staines. 2010. *Monolepta ongi*, a new species from Lanyu Island, with redescription of its allied species *Monolepta longitarsoides* Chûjô. 1938 (Coleoptera: Chrysomelidae: Galeruciane). Proc. Entomol. Soc. Wash. 112:530–540.

Lee, C. F., P. L. Tian, and C. L. Staines. 2010. *Monolepta meihuai*, a new species from Taiwan, with redescription of its sibling species *Monolepta mandibularis* Chûjô, 1962 (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae). Coleopt. Bull. 64:303–311.

Maulik, S. 1936. The Fauna of British India, including Ceylon and Burma. Coleoptera. Chrysomelidae (Galerucinae). Taylor & Francis. London. 648 pp.

Medvedev, L. N. 1999. To the knowledge of Chrysomelidae (Coleoptera) from Nepal and adjacent regions. Veröff. Naturkundemus. Erfurt 18:181–187.

Mohamedsaid, M. S. 1997. The galerucine beetles of Sri Lanka, with descriptions of two new species (Coleoptera: Chrysomelidae). Stobaena 9:1–7.

Sprecher-Uebersax, E. 2000. Blattkäfer aus Nepal in den Sammlungen des Naturkundemuseums Erfurt 2. Teil (Insecta: Coleoptera: Chrysomelidae). Veröff. Naturkundemus. Erfurt. 19:139–151.

Wagner, T. 2007. *Monolepta* Chevrolat, 1837, the most speciose galerucine taxon: redescription of the type species *Monolepta bioculata* (Fabricius, 1781) and key to related genera from (Chrysomelidae, Coleoptera). J. Nat. Hist. 41:81–100.

Wagner, T. and S. Bieneck. 2012. Galerucine type material described by Victor Motschulsky in 1858 and 1866 from the Zoological Museum Moscow (Coleoptera: Chrysomelidae, Galerucinae). Entomol. Zts. 122:205–216.

Weise, J. 1915. Lieferung 7. Chrysomelidae und Coccinellidae. p.155–184. *in*: Ergebnisse der Zweiten Deutschen Zentral-Afrika-Expedition 1910–1911 unter Führung Adolf Friendrichs, Herzogs zu Necklenburg. Band I. Zoologie, Teil I. (Schubotz, H., ed.) Klinkhardt & Biermann. Leipzig, Germany. 597 pp. (in German)

Wilcox, J. A. 1973. Chrysomelidae: Galerucinae (Luperini: Luperina). p.433–664. *in*: Coleopterorum Catalogus Supplementa. Pars 78, Part 3. 2nd ed. (Wilcox, J. A., ed.) W. Junk. Gravenhage, The Netherlands. 232 pp.

Yu, P. Y., S. Y. Wang, and X. K. Yang. 1996. Economic Insect Fauna of China Fasc. 54. Coleoptera: Chrysomelidae (II). Science Press. Beijing, China. 324 pp. (in Chinese)

六線長腳螢金花的分類回顧
(鞘翅目：金花蟲科：螢金花蟲亞科)

李奇峰 [1,*]

摘要

李奇峰。2016。六線長腳螢金花的分類回顧 (鞘翅目：金花蟲科：螢金花蟲亞科)。台灣農業研究 65(1):1–7。

本文針對六線長腳螢金花蟲 (*Monolepta sexlineata* Chûjô, 1938) 的分類地位做評估，檢查所有同物異名的模式標本及世界各地所採集的非模標本，針對 *Monolepta duvivieri* Jacoby, 1904 及 *M. sexlineata* Chûjô, 1938 指定其選模標本，並對不同性別的診斷特徵以線圖描繪。

關鍵詞：金花蟲、分類學、內囊骨片。

投稿日期：2015 年 5 月 22 日；接受日期：2015 年 6 月 16 日。
[*] 通訊作者：chifeng@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所應用動物組副研究員。台灣 台中市。

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 65(1):8–17 (2016)
DOI: 10.6156/JTAR/2016.06501.02

研究報告

水稻 'LTH' 單基因系與 'CO 39' 近同源系對台灣稻熱病菌之反應

廖大經[1] 陳隆澤[2] 吳志文[3] 鍾嘉綾[4,*]

摘要

廖大經、陳隆澤、吳志文、鍾嘉綾。2016。水稻 'LTH' 單基因系與 'CO 39' 近同源系對台灣稻熱病菌之反應。台灣農業研究 65(1):8–17。

本研究探討由國際水稻研究所 (International Rice Research Institute; IRRI) 引進之 'LTH' 單基因系及 'CO 39' 近同源系等攜帶已知抗病基因之稻熱病判別品系，2011–2014 年共 5 個期作於行政院農業委員會農業試驗所嘉義分所進行旱田式稻熱病病圃之抗性反應。結果顯示，37.5% 之 'LTH' 單基因系及 71.4% 之 'CO 39' 近同源系，罹病等級中位數為 4 級或以下，即抗病性為中抗級或以上。其中，並以 'LTH' 單基因系之 *Piz-5* [來自 IRBLz5-CA 與 IRBLz5-CA(R)]、*Pib* (來自 IRBLb-B)、*Pi12*(t) (來自 IRBL12-M) 及 *Pita2* (來自 IRBLta2-Pi 與 IRBLta2-Re)，以及 'CO 39' 近同源系之 *Pik* [來自 IRBLk-Ka(CO)]、*Pikh* [來自 IRBLkh-K3(CO)] 及 *Pita2* [來自 IRBLta2-IR64(CO)] 等抗病基因之抗性最為穩定，表示這些抗病基因可能對病圃中大多數稻熱病菌生理小種具有抗性，抗病幅度較廣。某些貢獻親本來源相同的抗病基因，在 'LTH' 及 'CO 39' 兩種遺傳背景下的抗性反應不一致，例如來自 'Kanto 51' 的 *Pik* 以及來自 'K60' 的 *Pik-p*，在 'CO 39' 背景下的罹病反應表現為中等抗病，但在 'LTH' 背景表現為極感病，原因可能是 *Pik* 及 *Pik-p* 之抗性必須在具有其他抗病基因存在或秈稻背景下效應較強。此外，來自親本 'K3' 的 *Pik-h* 以及來自 'C101LAC' 的 *Pi1*，在 'LTH' 背景下所貢獻之抗性幅度較高，可使極感病之 'LTH' 罹病度下降 3–4 級，但在 'CO 39' 背景下罹病度則只下降 1 級。已知 'CO 39' 帶有 *Pia* 及 *Pi-CO39*(t) 兩個抗性基因，因此 *Pik-h* 及 *Pi1* 的表現可能受 'CO 39' 背景中的抗性效應所遮蔽。由試驗結果，建議在台灣使用 'LTH' 背景的判別品種，可避免檢定結果受內生遺傳背景遮蔽效應之影響，對於生理小種的鑑別度可能較佳。本研究亦發現到，某些帶相同抗性基因之判別品種與其貢獻親之抗病反應不一致，除了遺傳背景之差異外，亦可能與某些貢獻親如 'BL1' 及 'Toride 1' 等帶有 1 個以上抗病基因，不同抗病基因之效應而使貢獻親更為抗病有關。

關鍵詞：*Magnaporthe oryzae*、病圃、判別品系、抗病基因。

前言

稻熱病是極具破壞性的水稻真菌性病害，由子囊菌 *Magnaporthe oryzae* (無性世代 *Pyricularia oryzae*) 產生的分生孢子侵染水稻而致病，通常對於稻穀產量及品質造成嚴重損失。根據前台灣省政府農林廳 1985 年 (Department of Agriculture and Forestry, Taiwan Provincial Government 1985) 統計資料指出，1966–1984 年間台灣第 1 期作葉稻熱病之平均發生面積為 38,840 ha，穗稻熱病之平均發生面積為 29,433 ha，第 2 期作葉稻熱病之平均發生面積為 6,372 ha，穗稻熱病為 3,845 ha。

投稿日期：2015 年 4 月 7 日；接受日期：2015 年 5 月 26 日。
* 通訊作者：clchung@ntu.edu.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系助理研究員。台灣 嘉義市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系前研究員。台灣 嘉義市。
[3] 農委會高雄區農業改良場作物改良課研究員。台灣 屏東縣。
[4] 國立台灣大學植物病理與微生物學系助理教授。台灣 台北市。

Tsai (1988) 估計葉稻熱病造成水稻產量的損失，發現「台農 67 號」葉稻熱病斑面積率為 25、55 及 80%，產量損失率分別可達 21.40、54.19 及 81.91%。稻熱病菌與寄主之間的交互作用，可以用「基因對基因」(gene-for-gene) 的理論來解釋 (Flor 1956)，亦即對於寄主中的特定抗病 Resistance (R) 基因，只有在病原菌存在與其對應的非致病力 Avirulence (Avr) 基因時，才能透過 R 蛋白與 Avr 蛋白之專一性辨識，啟動細胞內的防禦機制而呈現抗病反應。根據 R-Avr 之對應關係，水稻病理及育種學者開發出一系列的「判別品種」(differential varieties)，做為鑑別稻熱病菌生理小種及監視其發生變化之用。

常見之稻熱病判別品種，由早期抗病基因不詳的自然品種，到目前利用遺傳學技術所育成帶有已知抗病基因的品種 (Kiyosawa 1984)。Hung *et al*. (1961) 根據人工接種及田間觀察試驗結果，選出「崑山五香粳」、「台中 65 號」、「稗稈稻」、「台中 171 號」、「嘉農 242 號」、「光復 1 號」、「嘉農育 280 號」、「台中糸比 33 號」、「關東 51 號」、「農林 21 號」、「戰捷」、'Custugulcul'、'Natala'、「高腳柳州」、「高雄大粒清油」及「台中低腳烏尖」等 16 個台灣判別品種。Latterell *et al*. (1965) 強調建立一套國際共同使用之稻熱病判別品種的重要性，其後由美、日學者以世界各國所蒐集之菌株，篩選出一套包含稉、秈型稻之國際判別品種 (Atkins *et al*. 1967)，分別是 'Raminad Str. 3'、'Zenith'、'NP125'、'Usen'、'Dular'、'Kanto 51'、'Sha-tiao-tsao' 及 'Caloro' 等 8 個品種。以上台灣及國際判別品種，由於未進行抗病基因的遺傳分析，因此無法根據 Flor 的學說鑑別不同的生理小種 (Kato *et al*. 2004)。Yamada *et al*. (1976) 改進了前項缺失，選出了 'Shin 2'、'Aichi-asahi'、'Ishikari-shiroke'、'Kanto 51'、'Tsuyuake'、'Fukunishiki'、'Yashiro-mochi'、'Pi No. 4'、及 'Toride 1' 等 9 個遺傳背景不同，但帶有已知單一抗病基因的日本判別品種。Mackill & Bonman (1992) 以回交育種法，發展出一套以 'CO 39' 為遺傳背景且帶單一抗病基因的秈型近同源系 (near-isogenic lines) 判別品種，這套判別品種的優點在於遺傳背景接近，可降低不同遺傳背景對於鑑別度的干擾。惟其缺點在於 'CO 39' 並非真正的感病品種，它帶有 *Pia* (Imbe *et al*. 1997; Tsunematsu *et al*. 2000; Telebanco-Yanoria *et al*. 2011) 與 *Pi-CO39*(t) (Smith & Leong 1994; Farman & Leong 1998; Chauhan *et al*. 2002) 等 2 個抗病基因，所以不是真正的單抗性品種。為了建構一套適合各國使用的標準判別品種，IRRI (International Rice Research Institute) 與日本合作，以中國大陸的稉型普感品種「麗江新團黑谷」('Lijiangxintuanheigu'，簡稱 'LTH') 為輪迴親，開發出一套以 'LTH' 為背景，包含 24 個抗病基因，總計 31 個單基因系品系 (Tsunematsu *et al*. 2000)。Kobayashi *et al*. (2007) 則發展出一套以 'CO 39' 為背景，包含 14 個抗病基因，總計 20 個近同源系的秈型判別品系，提供熱帶或栽培秈型稻為主的國家或地區使用。至此，稻熱病判別品種已經進化至遺傳背景近似且帶已知單抗病基因，不僅對於生理小種鑑別度大幅提高，也可以做為導入或堆疊抗病基因至感病品種的育種材料。

'LTH' 與 'CO 39' 背景的兩套判別品系自推出以來，受到各方深入探討及廣泛應用，惟其在台灣田間自然感病狀況下的抗病反應模式，尚未有系統性的研究報告。田間生理小型會隨著栽培品種的種類、面積及年度期作間的氣象條件而發生改變，進而表現當時稻熱病發生程度的大小，其變化的速度與複雜性，非室內人工接種所能模擬。本研究由抗病育種的觀點，探討這兩套判別品系在田區多年度與期作間的抗病反應模式，可以提供生理小種組成類型及變化的訊息，並可瞭解推廣或新育成品種對於生理小種類型的反應，有助於防治稻熱病流行的發生。另外，也使育種人員瞭解在當地表現抗病性強且穩定的抗病基因，以作為抗病育種的參考。

材料與方法

參試水稻品種 (系)

本研究所使用之水稻品種 (系)，包括 31 個 'LTH' 單基因系 (表 1)、20 個 'CO 39' 近同

源系 (表 2)、對照親本 'LTH' 與 'CO 39' (以上係 2011 年透過行政院農業委員會高雄區農業改良場自 IRRI 引進)，以及貢獻親本 'Aichi Asahi' 等 11 個品種 (表 3)，共計 64 個品種 (系)。

表 1. 2011–2014 年 'LTH' 單基因系在嘉義稻熱病圃中的反應。

Table 1. Response of rice variety 'LTH' monogenic lines to leaf blast at the upland blast nursery in Chiayi during 2011–2014.

Designation	Resistance gene	Donor variety	Disease severity[z]					
			A	B	C	D	E	Median[y]
IRBLa-A	*Pia*	Aichi Asahi	9	9	7	7	9	9
IRBLa-C	*Pia*	CO 39	-[x]	9	9	9	9	9
IRBLi-F5	*Pii*	Fujisaka 5	-	9	9	9	9	9
IRBLks-F5	*Pik-s*	Fujisaka 5	7	9	9	9	9	9
IRBLks-S	*Pik-s*	Shin 2	9	6	7	7	9	7
IRBLk-Ka	*Pik*	Kanto 51	7	9	7	9	9	9
IRBLkp-K60	*Pik-p*	K60	7	9	9	9	9	9
IRBLkh-K3	*Pik-h*	K3	5	7	6	7	4	6
IRBLz-Fu	*Piz*	Fukunishiki	7	9	6	7	4	7
IRBLz5-CA	*Piz-5*	C101A51	2	2	4	4	4	4
IRBLz5-CA (R)	*Piz-5*	C101A51	4	2	4	2	4	4
IRBLzt-T	*Piz-t*	Toride 1	9	9	9	9	9	9
IRBLta-K1	*Pita*	K1	4	2	5	4	9	4
IRBLta-CT2	*Pita*	C105TTP2L9	6	7	7	5	4	6
IRBLta-CP1	*Pita*	C101PKT	5	7	6	4	7	6
IRBLb-B	*Pib*	BL1	2	4	4	4	4	4
IRBLt-K59	*Pit*	K59	8	9	9	8	9	9
IRBLsh-S	*Pish*	Shin 2	4	6	9	4	9	6
IRBLsh-B	*Pish*	BL1	4	6	9	4	9	6
IRBL1-CL	*Pi1*	C101LAC	4	4	6	7	9	6
IRBL3-CP4	*Pi3*	C104PKT	8	9	9	6	9	9
IRBL5-M	*Pi5*(t)	RIL249 (Moroberekan)	4	4	8	4	9	4
IRBL7-M	*Pi7*(t)	RIL29 (Moroberekan)	4	4	6	4	9	4
IRBL9-W	*Pi9*(t)	WHD-IS-75-1-127	5	4	4	4	4	4
IRBL12-M	*Pi12*(t)	RIL10 (Moroberekan)	4	4	4	4	4	4
IRBL19-A	*Pi19*(t)	Aichi Asahi	9	9	9	8	9	9
IRBLkm-Ts	*Pik-m*	Tsuyuake	6	4	5	4	4	4
IRBL20-IR24	*Pi20*	ARL24	4	3	5	4	4	4
IRBLta2-Pi	*Pita2*	Pi No. 4	4	4	4	2	4	4
IRBLta2-Re	*Pita2*	Reiho	2	4	4	4	4	4
IRBL11-Zh	*Pi11*(t)	Zhaiyeqing 8	4	2	4	4	7	4
LTH	-	-	9	8	9	9	9	9

[z] The severity score was evaluated based on a 0–9 scale developed by IRRI. Each data point is the maximum score from two replicates. A: 2nd crop season in 2011; B: 1st crop season in 2013; C: 2nd crop season in 2013; D: 1st crop season in 2014; and E: 2nd crop season in 2014.

[y] Median of the disease scores from all the trials (A–E).

[x] Missing data.

表 2. 2011–2014 年 'CO 39' 近同源系在嘉義稻熱病圃中的反應。

Table 2. Response of rice variety 'CO 39' near-isogenic lines to leaf blast at the upland blast nursery in Chiayi during 2011–2014.

Designation	Resistance gene	Donor variety	Disease severity[z]					
			A	B	C	D	E	Median[y]
IRBLsh-Ku[CO]	*Pish*	Kusabue	3	4	5	4	4	4
IRBLsh-S[CO]	*Pish*	Shin 2	3	5	5	4	5	5
IRBLsh-B[CO]	*Pish*	BL1	3	-[x]	5	4	5	5
IRBLb-IT13[CO]	*Pib*	IRAT 13	2	2	5	2	-	2
IRBLz5-CA[CO]	*Piz-5*	C101A51	-	-	-	-	-	-
IRBLzt-IR56[CO]	*Piz-t*	IR56	3	2	5	4	4	4
IRBL5-M[CO]	*Pi5*(t)	RIL249 (Moroberekan)	5	6	5	5	5	5
IRBLks-CO[CO]	*Pik-s*	Caloro	5	7	5	5	6	5
IRBLk-Ku[CO]	*Pik*	Kusabue	3	4	5	4	5	4
IRBLk-Ka[CO]	*Pik*	Kanto 51	4	4	4	4	4	4
IRBLkh-K3[CO]	*Pik-h*	K3	3	3	4	4	4	4
IRBLkm-Ts[CO]	*Pik-m*	Tsuyuake	-	-	-	-	-	-
IRBLkp-K60[CO]	*Pik-p*	K60	4	5	5	4	4	4
IRBL1-CL[CO]	*Pi1*	C101LAC	3	4	5	4	4	4
IRBL7-M[CO]	*Pi7*(t)	RIL29 (Moroberekan)	3	5	5	4	4	4
IRBLta-Ya[CO]	*Pita*	Yashiromochi	3	4	5	4	3	4
IRBLta-Me[CO]	*Pita*	Metica 1	3	5	5	4	4	4
IRBLta2-Pi[CO]	*Pita-2*	Pi No. 4	-	-	-	-	-	-
IRBLta2-Re[CO]	*Pita-2*	Reiho	2	5	4	4	4	4
IRBLta2-IR64[CO]	*Pita-2*	IR64	2	2	4	4	4	4
CO 39	-	-	4	6	6	5	5	5

[z] The severity score was evaluated based on a 0–9 scale developed by IRRI. Each data point is the maximum score from two replicates. A: 2nd crop season in 2011; B: 1st crop season in 2013; C: 2nd crop season in 2013; D: 1st crop season in 2014; and E: 2nd crop season in 2014.

[y] Median of the disease scores from all the trials (A–E).

[x] Missing data.

稻熱病病圃設置方法

'LTH' 單基因系、'CO 39' 近同源系、對照親本及貢獻親本於 2011 年第 2 期作、2013 年第 1、2 期作及 2014 年第 1、2 期作種植於嘉義農業試驗分所旱田式病圃 (經度 120°28'03"E，緯度 23°29'05"N)，試驗田採順序排列，重複 2 次。各參試品種 (系) 條播種植 1 行，每行播種 5 g 種子，行長 50 cm，行距 10 cm，每隔 10 行種植 2 行感病品種 'Lomello'，同時中間夾播 1 行抗病品種「台農 70 號」作為對照品種，周圍邊行則全數播種 'Lomello' 作為感染源。肥料施用量每公頃施用台灣肥料公司之硫酸銨 240 kg，過磷酸鈣 36 kg，氯化鉀 48 kg。稻種發芽後，每日早晨與黃昏於葉面上各噴灑水霧數次，以維持葉面適當濕度促進發病。

稻熱病調查方法與標準

依據 IRRI 所訂定之葉稻熱病罹病度評估方法及標準 (International Rice Research Institute 2002)，分別於播種後 30 d 及 40 d 各調查 1 次，每行給予一個罹病等級，最後以兩次調查、各兩重複之評估結果中最嚴重之等級，作為該品種 (系) 當年度罹病程度之代表。罹病等級分 0–9 級記載，罹病等級對應於罹病反應，

表 3. 2011–2014 年貢獻品種對病原菌的反應。

Table 3. Response of rice donor varieties to leaf blast at the upland blast nursery in Chiayi during 2011–2014.

Donor variety	Resistance gene	Disease severity[z]					
		A	B	C	D	E	Median[y]
Aichi Asahi	*Pia*, *Pi19*(t)	9	9	9	9	9	9
Shin 2	*Pik-s*, *Pish*	9	7	8	7	6	7
Kanto 51	*Pik*	7	6	9	7	5	7
Fukunishiki	*Piz*	9	7	9	7	6	7
Toride 1	*Piz-t*, *Pish*	2	4	4	4	5	4
BL1	*Pib*, *Pish*	2	4	4	4	3	4
K59	*Pit*	8	8	8	7	9	8
Tsuyuake	*Pik-m*	9	7	9	7	6	7
Pi No. 4	*Pita2*	6	6	6	6	5	6
Caloro	*Pik-s*	2	4	4	4	5	4
Yashiromochi	*Pita*	6	6	5	5	5	5

[z] The severity score was evaluated based on a 0–9 scale developed by IRRI. Each data point is the maximum score from two replicates. A: 2nd crop season in 2011; B: 1st crop season in 2013; C: 2nd crop season in 2013; D: 1st crop season in 2014; and E: 2nd crop season in 2014.

[y] Median of the disease scores from all the trials (A–E).

可分為 0 級：極抗 (HR)；1–3 級：抗 (R)；4 級：中抗 (MR)；5–6 級：中感 (MS)；7–8 級：感 (S)；9 級：極感 (HS)。

結果

‘LTH’ 單基因系與 ‘CO 39’ 近同源系判別品系對病原菌之罹病反應

‘LTH’ 單基因系與 ‘CO 39’ 近同源系之判別品系，在 2011–2014 年不同期作共 5 次檢定的罹病反應，如表 1 與表 2 所示。其中，IRBLz5-CA[CO]、IRBLkm-Ts[CO] 與 IRBLta2-Pi[CO] 等 3 個判別品系由於引種後繁殖失敗，因此無法得知其罹病反應。對照親本 ‘LTH’ 在 5 次檢定之罹病等級均為 8–9 級，中位數為 9 級，呈極感病級反應； ‘CO 39’ 除 2011 年第二期作之罹病等級為 4 級外，其餘 4 次檢定的罹病等級均為 5–6 級，中位數為 5 級，呈中等感病級反應。‘LTH’ 單基因系與 ‘CO 39’ 近同源系之在各年度期作間之罹病等級，中位數分布由 2 級至 9 級。比較 ‘LTH’ 單基因系與其對照親本 ‘LTH’ 之罹病反應，可發現罹病度中位數 8–9 級，可視為與 ‘LTH’ 同樣感病者包括 IRBLa-A 與 IRBLa-C (帶 *Pia* 基因)、IRBLi-F5 (帶 *Pii* 基因)、IRBLks-F5 與 IRBLks-S (帶 *Pik-s* 基因)、IRBLk-Ka (帶 *Pik* 基因)、IRBLkp-K60 (帶 *Pik-p* 基因)、IRBLzt-T (帶 *Piz-t* 基因)、IRBLt-K59 (帶 *Pit* 基因)、IRBL3-CP4 (帶 *Pi3* 基因) 及 IRBL19-A [帶 *Pi19*(t) 基因] 等 10 個品系共 9 個抗病基因。罹病度中位數為 5–7 級，與 ‘LTH’ 較具有輕度抗性者包括 IRBLks-S (帶 *Pik-s* 基因)、IRBLkh-K3 (帶 *Pik-h* 基因)、IRBLz-Fu (帶 *Piz* 基因)、IRBLta-CT2 與 IRBLta-CP1 (帶 *Pita* 基因)、IRBLsh-S 與 IRBLsh-B (帶 *Pish* 基因) 及 IRBL1-CL (帶 *Pi1* 基因) 等 8 個品系共 6 個抗病基因。罹病等級中位數為 4 級，表現為中等抗性者包括 IRBLz5-CA 與 IRBLz5-CA(R) (帶 *Piz-5* 基因)、IRBLta-K1 (帶 *Pita* 基因)、IRBLb-B (帶 *Pib* 基因)、IRBL7-M [帶 *Pi7*(t) 基因]、IRBL9-W [帶 *Pi9*(t) 基因]、IRBL12-M [帶 *Pi12*(t) 基因]、IRBL20-IR24 (帶 *Pi20* 基因)、IRBLta2-Pi 與 IRBLta2-Re (帶 *Pita2* 基因) 及 IRBL11-Zh [帶 *Pi11*(t) 基因] 等 11 個品系，共 9 個抗病基因，占 ‘LTH’ 單基因系所帶 24 個抗病基因數量之 37.5%。

比較 ‘CO 39’ 近同源系與其對照親 ‘CO 39’ 之罹病反應，罹病度中位數為 5 級，與 ‘CO 39’ 同樣具中等感病性者為 IRBLsh-S[CO] 與

IRBLsh-B[CO] (帶 *Pish* 基因)、IRBL5-M[CO] [帶 *Pi5*(t) 基因] 及 IRBLks-CO[CO] (帶 *Pik-s* 基因) 等 4 個品系共 3 個抗病基因。罹病等級中位數為 4 級，較 'CO 39' 稍具抗性者包括 IRBLsh-Ku[CO] (帶 *Pish* 基因)、IRBLz5-CA[CO] (帶 *Piz-5* 基因)、IRBLzt-IR56[CO] (帶 *Piz-t* 基因)、IRBLk-Ku[CO] 與 IRBLk-Ka[CO] (帶 *Pik* 基因)、IRBLkh-K3[CO] (帶 *Pik-h* 基因)、IRBLkp-K60[CO] (帶 *Pik-p* 基因)、IRBL1-CL [CO] (帶 *Pi1* 基因)、IRBL7-M[CO] [帶 *Pi7*(t) 基因]、IRBLta-Ya[CO] 與 IRBLta-Me[CO] (帶 *Pita* 基因) 及 IRBLta2-Pi[CO]、IRBLta2-Re[CO] 與 IRBLta2-IR64[CO] (帶 *Pita2* 基因) 等 14 個品系共 9 個抗病基因。罹病等級中位數為 2 級，表現呈抗性者僅有 IRBLb-IT13[CO] (帶 *Pib* 基因)。以上，總計有 15 個品系共 10 個抗病基因表現出中抗以上的反應，占 'CO 39' 近同源系所有抗病基因數量之 71.4%。

貢獻親之罹病反應

單基因系與近同源系之判別品系，其貢獻親的罹病反應如表 3 所示。貢獻親本在各年度期作間罹病等級中位數之分布由 4 級至 9 級，其中罹病等級中位數為 6 級以上，表現中等感病以上反應者，有 'Aichi Asahi' [帶 *Pia* 與 *Pi19*(t) 基因]、'Shin 2' (帶 *Pik-s* 與 *Pish* 基因)、'Kanto 51' (帶 *Pik* 基因)、'Fukunishiki' (帶 *Piz* 基因)、'K59' (帶 *Pit* 基因)、'Tsuyuake' (帶 *Pik-m* 基因)、'Pi No. 4' (帶 *Pita2* 基因) 及 'Yashiromochi' (帶 *Pita* 基因) 等 8 個品種。罹病等級中位數為 4 級，表現中等抗病反應者，有 'Toride 1' (帶 *Piz-t* 基因)、'BL1' (帶 *Pib* 與 *Pish* 基因) 及 'Caloro' (帶 *Pik-s* 基因) 等 3 個品種。

討論

IRRI 所開發之 'LTH' 單基因系與 'CO 39' 近同源系稻熱病判別品系，目前已普遍使用於稻熱病菌族群或單一菌株生理小種之判斷，及作為探討水稻抗性基因表現時之對照。相關研究多於秧苗期以人工接種方式進行，而在病圃以自然發病的研究方式相對較少。人工接種能明確瞭解各判別品種對於特定菌株之抗感性，但所選用菌株之代表性、致病能力的穩定度，以及秧苗期接種後通常僅有一次感染循環，均可能影響最後的罹病表現。病圃通常設置在易於發生稻熱病的地方，病圃內種植的檢定品種 (系) 種類繁多且定期更換，因此病原菌生理小種的種類與數量也隨著時間不斷發生變化 (Ou 1985)。在病圃中進行稻熱病檢定，可使檢定品種 (系) 受到當地各類生理小種的侵染，藉此瞭解病原菌族群組成，且在病圃多次感染循環之下，其檢定結果可視為秧苗至成株之整體表現，相對而言更加趨近田間實際發病情況。但病圃檢定對於檢定品種與已知生理小種之間抗感性的對應關係，以及檢定品種對於不同生理小種之抗幅大小，則無從得知。本研究使用的病圃已經有 40 年的歷史，主要作為檢定台灣各農業試驗改良場 (所) 提供之新育成品種 (系) 稻熱病抗性的場所，每年檢定約 2,000 個品種 (系)，包含稉型稻、秈型稻及糯稻等。在 2011–2014 年試驗期間，對照親本 'LTH' 在病圃中完全表現極感病級，另一對照親本 'CO 39' 除 2011 年第 2 期作表現中等抗級外，其他期作均為中感病級，顯示本病圃的發病情況穩定，其檢定結果有相當的可靠度。

本研究中表現抗性之 'LTH' 單基因系與 'CO 39' 近同源系判別品系大多數為中抗級，無高強度抗病的品種。顯示在台灣這兩套判別品系所帶之有效 R 基因，在田間對於不同生理小種的抗病強度為中等。其中，來自 'LTH' 單基因系 IRBLz5-CA 與 IRBLz5-CA(R) 的抗病基因 *Piz-5*、IRBLb-B 的 *Pib*、IRBL12-M 的 *Pi12*(t) 及 IRBLta2-Pi 的 *Pita2*，'CO 39' 近同源系 IRBLk-Ka[CO] 的 *Pik*、IRBLkh-K3[CO] 的 *Pik-h* 及 IRBLta2-IR64[CO] 的 *Pita2*，在不同生長年度與期作間 5 次檢定的抗病表現一致穩定，表示對於病圃中大多數的生理小種都具有抗病性。關於 'LTH' 基因系抗病基因 *Piz-5*、*Pib*、*Pi12*(t) 與 *Pita2* 之抗幅大小，Tsunematsu *et al*. (2000) 以 12 個菲律賓菌株對 'LTH' 單基因系及其貢獻親本進行人工接種，其抗幅分別為 91.7、41.7、33.3 及 75.0%。Cho *et al*. (2005) 於韓

國分別自粳稻與秈稻蒐集共計 30 個菌株進行人工接種，其抗幅分別為 93.3、23.3、40.0 及 26.7%。

Telebanco-Yanoria *et al*. (2008) 以 20 個菲律賓菌株進行人工接種，其抗幅分別為 95.0、30.0、35.0 及 80.0%。Wang *et al*. (2013) 於中國大陸吉林省蒐集 44 個當地菌株進行人工接種，其抗幅分別為 81.8、54.5、72.7 及 29.5%。在 'CO 39' 近同源系判別品種之抗幅大小方面，Telebanco-Yanoria *et al*. (2011) 以 20 個菲律賓菌株對進行人工接種，*Pik*、*Pik-h* 及 *Pita2* 的抗幅分別為 70、70 及 85%。綜合上述文獻有關人工接種之檢定結果顯示，'LTH' 單基因系所帶之 *Piz-5* 在菲律賓、韓國及中國大陸的抗幅較廣，*Pib* 則一致表現較低的抗幅；*Pita2* 在菲律賓，與 *Pi12*(t) 在中國大陸有較廣的抗幅。'CO 39' 近同源系所帶之 *Pik*、*Pik-h* 與 *Pita2*，在菲律賓則均有廣幅抗性。對照本研究病圃自然發病反應結果，*Piz-5* 在台灣、菲律賓、韓國及中國大陸有普遍的抗性，*Pik*、*Pik-h* 與 *Pita2* 在台灣與菲律賓的抗病表現似乎較穩定且抗幅較廣。*Pib* 與 *Pi12*(t) 雖在大部分文獻中的抗幅較低，但是在本研究中其抗病穩定度仍有不錯的表現。其他如 'LTH' 單基因系之 IRBL9-W [帶 *Pi9*(t) 基因] 與 IRBL20-IR24 (帶 *Pi20* 基因)，'CO 39' 近同源系之 IRBL1-CL[CO] (帶 *Pi1* 基因) 與 IRBLta2-Re[CO] (帶 *Pita2* 基因) 等判別品種，在 5 次檢定中均僅有 1 次表現為中等感病反應，其餘均為中等抗病反應。以上 'LTH' 單基因系之 *Piz-5*、*Pib*、*Pi12*(t)、*Pita2*、*Pi9*(t) 與 *Pi20* 基因，以及 'CO 39' 近同源系之 *Pik*、*Pik-h*、*Pita2* 與 *Pi1* 基因可作為導入抗病育種的材料。目前國內有台灣大學植物病理與微生物學系沈偉強教授及農業試驗所陳繹年助理研究員，廣泛收集各地稻熱病菌菌株，並使用 IRBL 判別品種進行接種測試。未來若能整合判別品種接種台灣菌株的抗幅資料，並配合病圃檢定結果，將可更客觀且完整反映不同 R genes 在台灣的抗病強度與幅度。

某些來自相同貢獻親本的抗病基因，在 'LTH' 及 'CO 39' 兩種背景下其抗感病反應不一致。例如同樣來自貢獻親 'Kanto 51' 的抗病基因 *Pik*，在 'LTH' 背景下其罹病度中位數為 8 級，但是 'CO 39' 背景下罹病等級中位數為 4 級；來自 'K60' 的 *Pik-p*，在 'LTH' 背景罹病等級中位數為 9 級，'CO 39' 背景罹病等級中位數為 4 級。由於 'CO 39' 已知具有抗病基因 *Pia* 與 *Pi-CO39*(t)，因此 *Pik* 及 *Pik-p* 之抗性，可能須在具有其他抗病基因存在或秈稻背景下效應較強。本研究亦觀察到，有些抗病基因的表現會受 'CO 39' 背景中的抗性效應所遮蔽，例如同樣來自親本 'K3' 的 *Pik-h*，在 'LTH' 背景下罹病等級中位數為 6 級，'CO 39' 背景下罹病等級中位數為 4 級；來自 'C101LAC' 的 *Pi1*，在 'LTH' 背景下罹病等級中位數為 5 級，'CO 39' 背景下罹病等級中位數為 4 級 (*Pik-h* 及 *Pi1* 在 'LTH' 背景下所貢獻之抗性幅度較高，使極感病之 'LTH' 罹病度下降 3–4 級，在 'CO 39' 背景下則只讓罹病度下降 1 級)。'CO 39' 在本研究中的罹病反應為 5 級，其抗性除了來自 *Pia* 與 *Pi-CO39*(t)，亦可能是因台灣水稻栽培長期以來以粳稻為主，因此田間生理小種對於秈稻背景的致病性較弱所致。本研究結果顯示，為避免遺傳背景之遮蔽效應影響檢定結果，在台灣使用具 'LTH' 背景的判別品系，對於生理小種的鑑別度可能優於使用 'CO 39' 背景之判別品系。

比較 'LTH' 單基因系與 'CO 39' 近同源系判別品系及其貢獻親本之抗病反應，反應一致者有 *Pia*、*Pik-s*、*Piz*、*Pib*、*Pit*、*Pi19*(t) 及 *Pik-m* 等 7 個抗病基因。反應不一致者亦有 7 個抗病基因。其中，判別品系呈抗病反應而貢獻親本呈感病反應，有 *Pik* 的 IRBLk-Ka[CO] 與 'Kanto 51'，*Pish* 的 IRBLsh-S[CO] 與 'Shin 2'，*Pita2* 的 IRBLta2-Pi 與 'Pi No. 4'，及 *Pita* 的 IRBLta-Ya[CO] 與 'Yashiromochi' 等 4 個抗病基因。其中，除了 IRBLta2-Pi 之外，其他均屬於 'CO 39' 背景的判別品系，可能還是歸因於 'CO 39' 之遺傳背景效應所致。判別品系呈感病反應而貢獻親本呈抗病反應，則有 *Piz-t* 的 IRBLzt-T 與 'Toride 1'，*Pish* 的 IRBLsh-B 與 'BL1'，以及 *Pik-s* 的 IRBLks-CO[CO] 與 'Caloro' 等 3 個抗病基因。其原因可能是貢

獻親本本身即帶有不只 1 個抗病基因，例如 'BL1' 帶有 *Pib* 與 *Pish* (Tsunematsu *et al*. 2000)，'Toride 1' 帶有 *Piz-t* 與 *Pish* (Inukai *et al*. 1994)，不同抗病基因之效應累加而使貢獻親本更為抗病。但是，也並非帶 2 個抗病基因的親本其抗病性一定較強，仍然須視病原菌所帶 Avr 基因種類而定。例如 'K59' 帶有 *Pit* 及 *Pik-s* 抗病基因 (Tsunematsu *et al*. 2000)，而 'Caloro' 僅帶 1 個 *Pik-s*。'K59' 與 'Caloro' 在 Kobayashi *et al*. (2007) 的人工接種試驗中，對於非致病性菌株表現相同反應。但 'K59' 在本研究旱田病圃之罹病等級中位數為 8 級，呈感病反應，'Caloro' 罹病等級中位數則為 4 級，顯示在田間自然發病的條件下，病圃中稻熱病菌生理小種的組成與 Kobayashi *et al*. (2007) 所使用的人工接種菌株有所不同。再將貢獻親本 'K59'、'Caloro' 之抗性，對照 *Pit* 與 *Pik-s* 兩基因單獨存在於 'LTH' 單基因系或 'CO 39' 近同源系之表現，可發現其抗性應該也受到遺傳背景之影響。

引用文獻

Atkins, J. G., A. L. Robert, C. R. Adair, K. Goto, T. Kozaka, R. Yanagida, M. Yamada, and S. Matsumoto. 1967. An international set of rice varieties for differentiating races of Piriculariaoryzae. *Phytopathology* 57:297–301.

Chauhan, R. S., M. L. Farman, H. B. Zhang, and S. A. Leong. 2002. Genetic and physical mapping of a rice blast resistance locus, *Pi-CO39*(t), that corresponds to the avirulence gene *AVR1-CO39* of *Magnaporthe grisea*. Mol. Genet. Genom. 267:603–612.

Cho, Y. C., J. H. Roh, B. R. Kim, I. S. Choi, M. K. Kim, S. S. Han, Y. Fukuta, H. G. Hwang, and Y. G. Kim. 2005. Reaction of resistance genes of monogenic lines to rice blast (*Magnaporthe grisea*). Korean J. Breed. 37:155–161.

Department of Agriculture and Forestry, Taiwan Provincial Government. 1985. The Major Field Program in Taiwan: Forecast Service on Rice Diseases and Insect Pests 1966–1984. Department of Agriculture and Forestry. Nantou, Taiwan. 382 pp. (in Chinese)

Farman, M. L. and S. A. Leong. 1998. Chromosome walking to the *AVR1-CO39* avirulencegene of *Magnaporthe grisea*: Discrepancy between the physical and genetic maps. Genetics 150:1049–1058.

Flor, H. H. 1956. The complementary genetic systems in flax and flax rust. Adv. Genet. 8:29–54.

Hung, C. H., C. C. Chien, and S. Y. Lin. 1961. Study on the physiological races of *Piricularia oryzae* Cav. Agric. Res. 10:27–34. (in Chinese with English abstract)

Imbe, T., S. Oba, M. J. T. Yanoria, and H. Tsunematsu. 1997. A new gene for blast resistance in rice cultivar, IR24. Rice Genet. Newsl. 14:60–62.

International Rice Research Institute. 2002. Standard Estimation System for Rice. Los Baños, Philippines. 56 pp.

Inukai, T., R. J. Nelson, R. S. Zeigler, S. Sarkarung, I. Takamure, and T. Kinoshita. 1994. Differentiation of pathogenic races of rice blast fungus by using near-isogenic lines with *INDICA* genetic background. J. Fac. Agric. Hokkaido Univ. 66:27–35.

Kato, H., T. Imbe, H. Tsunematsu, and Y. Fukuta. 2004. Developing Rice Blast Differential Lines and Evaluating Partial Resistance for the Breeding of Durable Rice Varieties in the Tropics. Blessing from Nature and Science for the Future. IRRI Press. Los Baños, Philippines. 122 pp.

Kiyosawa, S. 1984. Establishment of differential varieties for pathogenicity test of rice blast fungus. Rice Genet. Newsl. 1:95–96.

Kobayashi, N., M. J. Telebanco-Yanoria, H. Tsunematsu, H. Kato, T. Imbe, and Y. Fukuta. 2007. Development of new sets of international standard differential varieties for blast resistance in rice (*Oryza sativa* L.). Jpn. Agric. Res. Q. 41:31–37.

Latterell, F. M., M. A. Marchetti, and B. R. Grove. 1965. Co-ordination of effort to establish an international system for race identification in *Piricularia oryzae*. p.257–274. *in*: The Rice Blast Disease. (Ou, S. H., ed.) Johns Hopkins Press. Baltimore, MD. 487 pp.

Mackill, D. J. and J. M. Bonman. 1992. Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice. Phytopathology 82:746–749.

Ou, S. H. 1985. Rice Diseases. Commonwealth Agricultural Bureaux Press. Slough. 380 pp.

Smith, J. R. and S. A. Leong. 1994. Mapping of a *Magnaporthe grisea* locus affecting rice (*Oryza sativa*) cultivar specificity. Theor. Appl. Genet. 88:901–908.

Telebanco-Yanoria, M. J., T. Imbe, H. Kato, H. Tsunematsu, L. A. Ebron, C. M. Vera Cruz, N. Kobayashi, and Y. Fukuta. 2008. A set of standard differential blast isolates [*Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr.] from the Philippines for rice (*Oryza sativa* L.) resistance. Jpn. Agric. Res. Q. 42:23–34.

Telebanco-Yanoria, M. J., Y. Koide, Y. Fukuta, T. Imbe, H. Tsunematsu, H. Kato, L. A. Ebron, T. M. N. Nguyen,

and N. Kobayashi. 2011. A set of near-isogenic lines of Indica-type rice variety CO 39 as differential varieties for blast resistance. Mol. Breeding 27:357–373.

Tsai, W. H. 1988. Estimation of rice yield losses caused by leaf blast disease. J. Agric. Res. China. 37:207–210. (in Chinese with English abstract)

Tsunematsu, H., M. J. T. Yanoria, L. A. Ebron, N. Hayashi, I. Ando, H. Kato, T. Imbe, and G. S. Khush. 2000. Development of monogenic lines of rice for blast resistance. Breeding Sci. 50:229–234.

Wang, J. C., Y. Jia, J. W. Wen, W. P. Liu, X. M. Liu, L. Li, Z. Y. Jiang, J. H. Zhang, X. L. Guo, and J. P. Ren. 2013. Identification of rice blast resistance genes using international monogenic differentials. Crop Prot. 45:109–116.

Yamada, M., S. Kiyosawa, T. Yamaguchi, T. Hirano, T. Kobayashi, K. Kushibuchi, and S. Watnabe. 1976. Proposal of a new method for differentiating races of *Pyricularia oryzae* Cavara in Japan. Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 42:216–219.

Response of Rice Varieties 'LTH' Monogenic Lines and 'CO 39' Near-Isogenic Lines to Rice Blast

Dah-Jing Liao[1], Lung-Che Chen[2], Chih-Wen Wu[3], and Chia-Lin Chung[4,*]

Abstract

Liao, D. J., L. C. Chen, C. W. Wu, and C. L. Chung. 2016. Response of rice varieties 'LTH' monogenic lines and 'CO 39' near-isogenic lines to rice blast. J. Taiwan Agric. Res. 65(1):8–17.

Two sets of rice blast differential lines introduced from IRRI, 'LTH' monogenic lines (MLs) and 'CO 39' near isogenic lines (NILs), were tested for response to rice leaf blast at the upland blast nursery at Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute for 5 cropping seasons during 2011–2014. The results showed that 37.5% of the 'LTH' MLs and 71.4% of the 'CO 39' NILs exhibited moderate to high resistance (disease severity ≤ 4). In particular, *Piz-5* [in IRBLz5-CA and IRBLz5-CA(R)], *Pib* (in IRBLb-B), *Pi12*(t) (in IRBL12-M), and *Pita2* (in IRBLta2-Pi) consistently showed high resistance, indicating that the four resistance genes might be incompatible with most of the *Magnaporthe oryzae* races in the nursery, therefore their resistance is likely to be more broad-spectrum. It was observed that some resistance genes had different reactions in the 'LTH' and 'CO 39' genetic backgrounds. For instance, *Pik* (from 'Kanto 51') and *Pik-p* (from 'K60') were moderately resistant in 'CO 39' background but highly susceptible in 'LTH' background, suggesting that their resistance may be more effective in the *Indica* background or the background containing other resistance gene(s). *Pik-h* (from 'K3') and *Pi1* (from 'C101LAC') conferred stronger resistance in 'LTH' background (reduction of 3–4 scales on severity) than in 'CO 39' background (reduction of 1 scale on severity), which may be due to the mask effect contributed from the resistance of *Pia* and *Pi-CO39*(t) in 'CO 39'. Because of the potential interference of mask effect in 'CO 39', the 'LTH' MLs can be a better differential system for the identification of effective *R* genes in Taiwan. It was also found that some differential lines and their donor parents reacted differently to blast, possibly due to the genetic background effects and/or the accumulative effects of multiple *R* genes in the genomes. 'BL1' and 'Toride 1', the donor lines carrying more than one *R* genes, showed higher resistance than their corresponding 'LTH' and 'CO 39' differential lines.

Key words: *Magnaporthe oryzae*, Blast nursery, Differential lines, Resistance genes.

Received: April 7, 2015; Accepted: May 26, 2015.

* Corresponding author, e-mail: clchung@ntu.edu.tw

1 Assistant Research Fellow, Agronomy Department, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

2 Former Research Fellow, Agronomy Department, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

3 Research Fellow, Crop Improvement Section, Kaohsiung District Agricultural Research and Extension Station, Pingtung, Taiwan, ROC.

4 Assistant Professor, Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 65(1):18–30 (2016)
DOI: 10.6156/JTAR/2016.06501.03 研究報告

利用質體參考物質以及多重聚合酶連鎖反應建構基改馬鈴薯之檢測與定量方法

杜元凱[1] 馮昱維[2] 吳明哲[3] 王熙宇[2] 陳述[4] 陳涵葳[1,*]

摘要

杜元凱、馮昱維、吳明哲、王熙宇、陳述、陳涵葳。2016。利用質體參考物質以及多重聚合酶連鎖反應建構基改馬鈴薯之檢測與定量方法。台灣農業研究 65(1):18–30。

基改作物一般無法以外觀型態加以區分，而透過以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 所發展的各項檢測技術，則可明確進行篩選與區別。本研究針對基因改造馬鈴薯 EH92-527-1 品系，利用該品系邊界序列 (flanking sequence) 與馬鈴薯 *UGPase* 序列將其構築於質體參考物質 pGEM-EH92，利用即時聚合酶鏈鎖反應 (real-time PCR) 建立檢量線：決定係數 $R^2 = 0.99$，檢量範圍最低為 20 個拷貝數，3% (w/w) 偏誤值 (bias) 為 16.3%，相對標準誤差 (relative standard error) 介於 6–12.9%。顯示其確實可實質應用於檢測基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系，此質體參考物質兼具容易保存、便宜與穩定佳等優點。另外，以 EH92-527-1 品系之 *RNApol* (RNA polymerase) 與 *nptII* (Neomycin phosphotransferase II)、反義 *GBSS* (granule bound starch synthase) 基因為目標，建構多重聚合酶鏈鎖反應 (multiplex PCR) 反應，可得最低檢測極限為 3%，由此可大幅縮短檢測時間、檢測成本，並提升檢測準確度。

關鍵詞：基因改造、馬鈴薯、即時聚合酶鏈鎖反應、質體參考物質。

前言

依據國際農業生物技術應用推廣協會 (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications; ISAAA) 2013 年統計資料顯示，全球目前共有 27 個國家種植基因改造 (以下稱基改) 作物，總耕作面積已達 175,200,000 ha。其中，基改大豆占全球大豆生產量 79%，基改玉米則占全球玉米生產量 32%。目前台灣黃豆、玉米供給主要仰賴進口，可以種子形式、初級加工或高層次加工食品等型態輸入，在製造、加工、調配、包裝、運送、貯存及販賣的過程中，可能發生有意或無意的混雜風險。因此，衍生基改作物的環境安全性以及產品標識等需探討之疑慮，迄今仍為社會大眾所關切 (Conner *et al*. 2003; Crespi & Marette 2003)。我國衛生福利部於 2015 年 5 月 29 日公告「包裝食品含基因改造食品原料標示應遵行事項」、「食品添加物含基因改造食品原料標示應遵行事項」及「散裝食品含基因改造食品原料標示應遵行事項」，非基因改造食品原料非有意攙入基因改造食品原料超過 3%，即視為基因改造食品原料，須標示「基因改造」等字樣；日本標示界限為 5%，歐盟為 0.9%，美國是基改作物生產的主要國家，並無強制標示之規範 (Carter & Gruère 2006)。

基改作物一般無法以外觀型態加以區分，開發有效的檢測方式實為必需。以聚合酶連鎖

投稿日期：2014 年 12 月 16 日；接受日期：2015 年 6 月 8 日。
* 通訊作者：swaychen@tari.gov.tw
1 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
2 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。
3 農業科技研究院植物科技研究所研究員兼所長。台灣 新竹市。
4 農委會農業試驗所作物種原組副研究員。台灣 台中市。

反應 (polymerase chain reaction; PCR) 為基礎所發展的各項檢測技術，具高敏感性、高專一性，適合大量篩選工作，配合外源基因與插入受體植物之邊界序列 (flanking sequence) 設計引子 (primer)，便可區分基改作物之品系 (event)，是目前基改作物最主要的檢測方法 (Lipp *et al*. 2001)。一般 PCR 或多重 PCR (multiplex PCR; mPCR)，屬於定性的檢測方式。而在定量檢測方面，早期多以競爭型 PCR 進行相對定量 (Hupfer *et al*. 2000)，目前則以即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time PCR) 為主要定量方法，其他定量檢測技術還包括數位 PCR (digital PCR) 與微陣列晶片 (microarray) 等。

基改作物檢測之認證標準品 (certified reference materials; CRM)，為經過日本基因公司 (Nippon Gene Co., Ltd)、歐盟聯合研究中心之下的參考物質暨量測研究中心 (Institute for Reference Materials and Measurements; IRMM) 或美國油品化學協會 (American Oil Chemists' Society; AOCS) 等機構認證，確保標準品之品質與檢測能力後，始得做為標準品使用。然而，CRM 是由植物組織經冷凍乾燥後製成，具有不易保存、價格昂貴等缺點，且並非所有基改作物皆能取得而製備 CRM。為克服 CRM 之缺點，可利用同時帶有特定基改作物品系物種專一性序列以及品系專一性序列的質體，此質體參考物質 (plasmidic reference materials; PRM) 便可作為定性或定量檢測之標準品。由於 PRM 製備簡單、操作便捷，可望發展成為 CRM 的替代使用物質 (Kuribara *et al*. 2002; Shindo *et al*. 2002)。

基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系利用基因默化 (gene silencing) 技術，降低內生顆粒結合澱粉酶 (granule bound starch synthase; *GBSS*) 之表現，以增加馬鈴薯球支鏈澱粉含量。本研究利用基因重組技術構築基改馬鈴薯 EH92-527-1 之質體參考物質 pGEM-EH92，內含馬鈴薯尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (UDP-glucose pyrophosphorylase; *UGPase*) 基因序列與 EH92-527-1 品系邊界序列，於 pGEM-EH92 質體即可同時檢測上述兩種序列，並應用 Real-time PCR 建立基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系 (BASF Plant Science®) 檢量線，由此取代 CRM 之購買與使用，開發穩定、低價且可依賴的 EH92-527-1 品系定量檢測方法。此外，本試驗針對基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系開發 mPCR 檢測技術，可同時檢測 EH92-527-1 品系 RNA 聚合酶基因 (RNA polymerase; *RNApol*)、抗抗生素篩選基因 (Neomycin phosphotransferase II; *nptII*)，以及 *GBSS* 基因反譯股序列。以上兩種定量與定性檢測方法之建立，期可做為未來開發基改作物檢測技術之參考。

材料與方法

試驗材料

本試驗之 CRM 皆購自 Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)，包括：(1) 基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系之塊莖粉末標準品 [ERM®-BF421a (0%, blank) 與 ERM®-BF421b (100%, level 1)]；(2) 基改馬鈴薯 AM04-1020 品系之塊莖粉末標準品 [ERM®-BF430a (0%, blank)、ERM®-BF430b (100%, level 1)]；(3) 基改大豆 Roundup Ready Soya 種子粉末標準品 [ERM®-BF410ak (0%, blank)、ERM®-BF410gk (10%)]。作為非基改馬鈴薯對照組之克尼伯 (Kennebec) 品系，購買自行政院農業委員會種苗改良繁殖場。植物基因體之 DNA 的萃取使用 Plant Genomic DNA Purification Kit (PROTECH, Taiwan)。

質體參考物質 pGEM-EH92 之構築與製備

本試驗所用之基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系之引子與探針，參考自 IRMM 提供之 EH92-527-1 品系專一序列及馬鈴薯內源性基因 (*UGPase*) 序列資訊。以基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系 CRM [ERM®-BF421b (100%)] 之基因體 DNA 為模板，分別以 UGP-F/UGP-R 及 EH92-RC F/EH92-RC R 引子對 (表 1)，進行第 1 次 PCR，增幅出 213 bp 之 *UGPase* 片段與 288 bp 之 EH92-527-1 品系專一性片段。由於 UGP-R 與 EH92-RC F 的 5' 端具有 24 個

表 1. 單一、多重與即時聚合酶鏈鎖反應中各別使用的引子對與探針名稱與序列。

Table 1. Primers and probes used in PCR, mPCR, recombinant PCR, and real-time PCR (RT-qPCR) in this research.

Target	Primer/Probe	Sequence (5' → 3')	Amplification length (bp)	Application
Event-specific	Event527-bf1	GTGTCAAAACACAATTTACAG	134	PCR, RT-qPCR
	St527-R1	TCCCTTAATTCTCCGCTCATGA		PCR, RT-qPCR
	St527-S2	AGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTT		RT-qPCR
	EH92-RC F	ACTTGGCTATGCTTCACATCACC-GAGAGGTGGCAAAAATTTTCAGAAGG	288	Recombinant PCR
	EH92-RC R	AACGTAAAACGGCTTGTCCC		Recombinant PCR
	as-gbss-F1	TGCCACATAAAAATCAAGAGTAACTA	189	mPCR
	as-gb-R	TGAGGGATACGCAGAACAGGTCAT		mPCR
UGPase	UGP-qr	GGACATGTGAAGAGACGGAG	86	PCR, RT-qPCR
	UGP-qF	CTACCTCTACCCCTCCGC		PCR, RT-qPCR
	Mhmg probe	CTACCACCATTACCTCGCACCTCCTCA		RT-qPCR
	UGP-F	TTATCCGGGAGAAGGTGGGAGT	213	Recombinant PCR
	UGP-R	CGGTGATGTGAAGCATAGCCAAGT		Recombinant PCR
	PhyRC-F	ACTTGGCTATGCTTCACATCACC-GGGAAGATCTCACATTTTTGTTATTCA		Recombinant PCR
nptII	sNPT-F	CGCATGATTGAACAAGATGGATTGC	420	mPCR
	sNPT-R	ATGTTTCGCTTGGTGGTCGAATGG		mPCR
RNA polymerase	RP-F	TCGTGGATTTTTCCGATCTC	862	mPCR
	RP-R	ATCTCGCTCCATCTCTCCAA		mPCR

互補的鹼基對，PCR 產物以 UGP-F/EH92-RCR 引子對進行第二次 PCR 時，可得 472 bp 之重組片段，將該片段次選殖至 pGEMT-Easy Vector (Promega) 後，即完成基改馬鈴薯 EH92-527-1 質體參考物質 pGEM-EH92 之構築 (圖 1)。質體 DNA 製備係接種單一菌落至含抗生素的液態培養基，以 100 rpm 轉速培養 8 h，再以 Mini *Plus*™ Plasmid DNA Extraction System (VIOGENE) 進行質體 DNA 的萃取，經分光光度計 (NanoDrop P1000, Thermo) 定量後保存，並送源資國際生物科技股份有限公司進行定序。

引子專一性確認

PCR 反應係針對馬鈴薯 *UGPase* 基因與基改馬鈴薯 EH92-527-1 轉殖系品系專一性序列，使用引子對 UGP-qF/UGP-qr 與 E527-1bf/S527-R (表 1) 進行專一性檢測，增幅產物為 86 bp 與 134 bp。反應溶液含基因體 DNA 100 ng、0.2 mM dNTPs (Promega)、1× PCR 緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% Triton X-100]、2 μM 引子對、1 unit ExcelTaq™ DNA polymerase (PREMIER)，總反應體積為 20 μL；以 94℃ 前處理 2 min，接續以 94℃變性處理 30 s、56℃處理 30 s、72℃反應 30 s，共計 35 個循環，最後以 72℃處理 7 min 後終止反應 (Veriti, ABI)，PCR 產物以 2% 之瓊脂膠體進行電泳分離。

Multiplex PCR

mPCR 反應係針對馬鈴薯 *RNA pol* 基因 (862 bp)、抗抗生素篩選 *nptII* 基因 (420 bp) 及 EH92-527-1 品系 anti-*GBSS* 序列 (189 bp) 進行同時檢測，使用 3 對引子 RP-F/RP-R、sNPT-F/sNPT-R 與 as-gbss-F1/as-gb-R 進行目標片段增幅 (表 1)。mPCR 反應液含基因體 DNA 100 ng、0.1 mM dNTPs (Promega)、1× PCR 緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% Triton

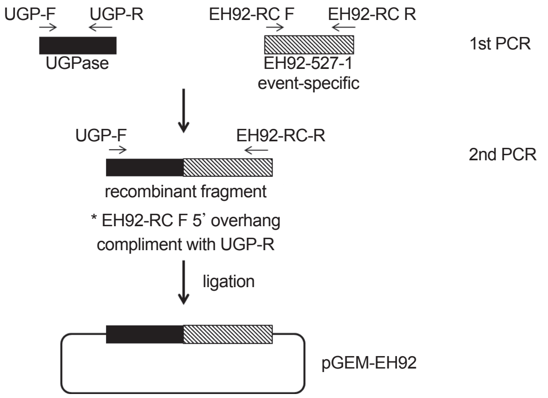


圖 1. 質體參考物質 pGEM-EH92 之構築策略。1st PCR 分別利用 UGP-F/R 以及 EH92-RC-F/R 將內生性基因 (*UGPase*) 及品系專一性序列 (event-specific) 以 PCR 的方式增幅。2nd PCR 利用 UGP-F 與 EH92-RC-R 進行 recombinant PCR，將兩個片段連接，最後再將此構築序列接合於 pGEM-T 載體。

Fig. 1. The strategy of plasmidic reference material pGEM-EH92 construction. UGP-F/R and EH92-RC-F/R primers were used to amplify potato endogenous gene *UGPase* and EH92-527-1 sequences in 1st PCR, respectively. Two amplicons from 1st PCR were joined together in 2nd PCR using UGP-F and EH92-RC-R primers. Finally, the recombinant fragment was put into pGEM-T vector.

X-100]、0.1 μM 引子對、2.5 units ExcelTaq™ DNA polymerase (PREMIER)，總反應體積為 20 μL；以 94℃前處理 2 min，接續以 94℃變性處理 30 s、56℃處理 30 s、72℃反應 30 s，共計 30 個循環，最後以 72℃處理 7 min 後終止反應 (Veriti, ABI)，PCR 產物以 2.5% 之瓊脂膠體進行電泳分離。

質體參考物質 pGEM-EH92 Real-time PCR

pGEM-EH92 為本試驗中基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系之 PRM，pGEM-EH92 質體 DNA 先以 *Sac*I 酵素酶切成線性形式 (linear form) 後，以分光光度計定量 (NanoDrop P1000, Thermo, USA)，測定 3 次至標準誤差 (standard deviation; SD) 小於 0.05，則視其平均值為 PRM 之起始濃度 (Kuribara *et al*. 2002)。依據公式 1 與 2 換算 PRM 的拷貝數 (copy numbers)，並稀釋成下列濃度：20、6.25 × 10^2、1.25 × 10^4、2.5 × 10^5 及 5 × 10^6 (copies/5 μL)。

$$\text{Copies number of PRM} = \frac{\text{Total PRM weight (g)}}{\text{PRM weight per molecule (g)}} \quad (1)$$

$$\text{PRM weight per molecule} = \text{Size (bp)} \times 660 \times 1.66 \times 10^{-24}\ \text{(g)} \quad (2)$$

PRM Real-time PCR 反應液含 20、6.25 × 10^2、1.25 × 10^4、2.5 × 10^5 及 5 × 10^6 copies (5 μL^{-1}) 不同拷貝數之 pGEM-EH92 質體 DNA、1× Gene expression master mix (ABI)，900 nM 引子對 (Event527-bf1/St527-R1 或 UGP-qF/UGP-qr)、250 nM 之螢光探針 (St527-S1 或 Mhmg probe)，偵測不同 PRM 拷貝數下品系專一性序列與 *UGPase* 含量 (表 1)，總反應體積為 25 μL。反應條件為 50℃下 2 min，95℃反應 10 min，接著 95℃下 15 s、60℃下 1 min，共 40 個循環 (ABI 7500, ABI)。每次試驗皆放置空白試驗組 (no template control; NTC)，每次試驗各樣品重複 3 次，將 3 次試驗之 Ct 值 (cycle threshold) 代入公式 3 估算拷貝數，並計算 3 次試驗之平均拷貝數與相對標準誤差 (relative standard deviation; RSD)，RSD 計算公式如公式 4。根據 20、6.25 × 10^2、1.25 × 10^4、2.5 × 10^5 及 5 × 10^6 個拷貝數之 PRM 所量測之 Ct 值，分別建立 EH92-527-1 品系專一序列和內生基因 (*UGPase*) 含量檢量線。

$$\text{Log}_{10}\ \text{(DNA)} = \frac{\text{Ct} - \text{Y Intercept}}{\text{Slop}} \quad (3)$$

$$\text{RSD} = \frac{\text{Standard deviation of copy number}}{\text{Mean of copy number}} \quad (4)$$

質體參考物質 pGEM-EH92 定量方法準確度 (accuracy) 與精準度 (precision) 分析

為測試利用質體參考物質 pGEM-EH92 進行基改馬鈴薯 EH92-527-1 定量檢測之準確度

與精準度，分別以 1、3 及 5% (w/w) 不同濃度之 EH92-527-1 馬鈴薯 CRM 做為待測樣品分別上機進行 Real-time PCR，反應液含 1、3 及 5% (w/w) 之基因體 DNA180 ng、1× Gene expression master mix (ABI)，900 nM 引 子對 (Event527-bf1/St527-R1 或 UGP-qF/UGP-qr)、250 nM 之螢光探針 (St527-S1 或 Mhmg probe)，分別檢測不同濃度組合 CRM 中品系專一性序列或 *UGPase* (表 1)，總反應體積為 25 μL，並以質體參考物質所建構之檢量線求得個不同濃度之量測值。最後計算偏誤值 (公式 4) 與相對標準誤差 (公式 5)，評估質體參考物質 pGEM-EH92 進行基改馬鈴薯 EH92-527-1 定量檢測之準確度與精準度。

$$\text{Bias} = \frac{\text{Mean value} - \text{True value}}{\text{True value}} \times 100\% \qquad (4)$$

$$\text{RSD} = \frac{\text{Standard deviation of values}}{\text{Mean value}} \times 100\% \qquad (5)$$

結果

質體參考物質 pGEM-EH92 之構築與製備

質體參考物質 pGEM-EH92 定序結果如圖 2，基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系專一性序列與 *UGPase* 之序列經比對後證實無誤，針對品系專一序列與 *UGPase* 設計之 Real-time PCR 引子與探針位置個別以箭頭與波浪線標示。

引子專一性確認

為確認本試驗中所使用之引子對序列之專一性，分別以 Kennebec 馬鈴薯、EH92-527-1、AM04-1020 轉殖馬鈴薯與 Roundup Ready 轉殖大豆基因體 DNA 為材料，利用 PCR 的方式進行檢測。結果指出，馬鈴薯內部對照基因之 *UGPase* 引子對只能對馬鈴薯的基因體 DNA 檢測出目標大小之片段 (86 bp) (圖 3A)；而 EH92-527-1 之品系專一性引子對只能對 100% EH92-527-1 之馬鈴薯基因體 DNA 檢測出目標片段 (134 bp)，對其他馬鈴薯基因體 DNA 及大豆的基因體 DNA 無法增幅出相

圖 2. 質體參考物質 pGEM-EH92 之序列。*UGPase* 引子為 UGP-qF 與 UGP-qR (箭號)，探針粘合位置為 Mhmg (波浪線)。基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系專一序列 (flanking sequence) 引子為 Event527-bf1 與 St527-R1 (箭號)，探針粘合位置為 St527-R2 (波浪線)。

Fig. 2. Result of sequencing for pGEM-EH92. UGP-qF and UGP-qR (arrow head) were used as primers, and Mhmg (wave line) was used as probe for *UGPase* sequence. Event527-bf1 and St527-R1 (arrow head) and St527-R2 (wave line) were used as primers and probe, respectively, for EH92-527-1 event-specific sequence.

應的片段 (圖 3B)，顯示本試驗所使用之內部對照基因之專一性引子對 (*UGPase*) 及 EH92-527-1 品系專一性引子皆具有高度專一性。

Multiplex PCR

利用 EH92-527-1 品系專一性、馬鈴薯內生性基因 (*RNA pol*) 和載體上特定序列 (*nptII*) 的引子對 as-gbss-F1/as-gb-R、RP-F/RP-R、sNPT-F/sNPT-R 進行 Multiplex PCR 檢驗，目標產物大小分別為 189 bp、862 bp 和 420 bp (圖 4)。並利用馬鈴薯標準品 100、75、50、25、10、5、3、1 及 0% (w/w) 進行最低檢測極限測試，結果顯示最低可偵測 3% (w/w) 馬鈴薯樣品 (圖 5)。

質體參考物質 pGEM-EH92 Real-time PCR

採用 EH92-527-1 品系專一性序列與馬鈴薯內部對照基因 (*UGPase*) 各自獨立進行 20、6×10^2、1.25×10^4、2.5×10^5 及 5×10^6 拷貝數 5 種濃度之 Real-time PCR，每種濃度 3 重複。結果如圖 6、7 所示，檢量線之決定係數 (R^2 value) 平均皆達到 0.99 以上，取得之標準曲線之斜率以及截距用來進行未知樣品之拷貝數的計算。本試驗結果所得如下：

UGPase:
$\log_{10}$ (DNA) = Ct − 40.34675/-3.54073

品系專一性序列：
$\log_{10}$ (DNA) = Ct − 42.56533/-3.63083

將所測得之平均 Ct 值利用帶入所建立之檢量線公式，並進行換算為拷貝數，計算所得之拷貝數的平均值及其 3 重複次實驗結果之 RSD 值如表 2 所示。結果顯示，不論是內部對照基因 (*UGPase*) 及 EH92-527-1 品系專一性序列的部分，預期之參考質體之濃度與實際拷貝數差異不大，3 次試驗結果之再現性表現亦佳。

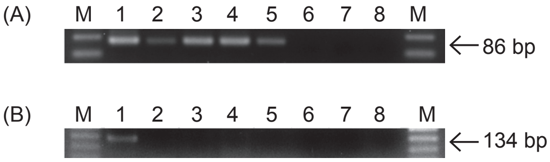


圖 3. 基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系專一引子與內生性基因引子 PCR 專一性確認。(A) 馬鈴薯內生性基因 (*UGPase*) 引子，預期增幅的 DNA 大小為 86 bp；(B) 基改馬鈴薯 EH92-527-1 專一性引子增幅 DNA 大小為 134 bp PCR 產物。

Fig. 3. Specificity validation of the taxon-specific and event-specific primers for transgenic potato EH92-527-1. (A) Taxon-specific primers for potato, expected PCR product is 86 bp; (B) EH92-527-1 event-specific primers for potato, expected PCR product is 134 bp. Lane M: 50bp DNA ladder; Lane 1: 100% EH92-527-1 potato CRM; Lane 2: 0% EH92-527-1 potato CRM; Lane 3: 100% AM04-1020 potato CRM; Lane 4: 0% AM04-1020 potato CRM; Lane 5: *Solanum tuberosum* (Kennebec); Lane 6: 10% Roundup Ready ™ Soya; Lane 7: 0% Roundup Ready ™ Soya; and Lane 8: ddH_2O.

質體參考物質 pGEM-EH92 定量方法之準確度與精準度分析

準確度與精準度分析結果如表 3 所示，1、3 及 5% (w/w) 偏誤值分別為 62、16.3 及 2.2%，相對標準誤差分別為 13.0、11.2 及 6.1%，除 1% 偏誤值大於 25% 外，其餘不同百分比之偏誤值與相對標準誤差均落於可接受範圍 25% 內，顯示本試驗所開發出之定量方法及質體參考物質 pGEM-EH92 之適用性及可信度俱佳。

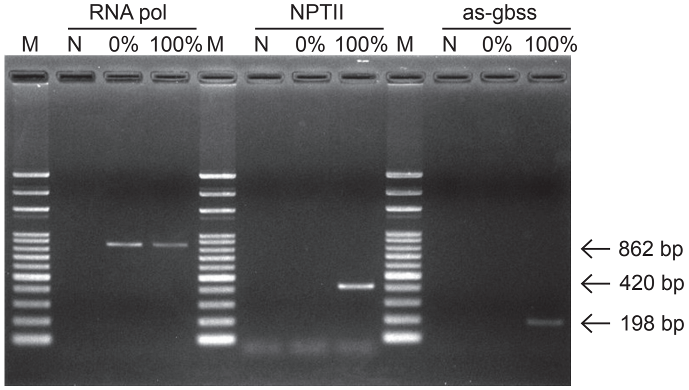


圖 4. *RNA pol*、*nptII* 及 anti-*GBSS* 基因之聚合酶鏈鎖反應之檢測結果電泳圖。M 行：100 bp DNA ladder；N 行：Negative control；0% 行：0% EH92-527-1 CRM；100% 行：100% EH92-527-1 CRM。

Fig. 4. Electrophoresis results of PCR amplification for *RNA pol*, *nptII*, and anti-*GBSS* gene. Lane M: 100 bp DNA ladder; Lane N: Negative control; Lane 0%: 0% EH92-527-1 CRM; and Lane 100%: 100% EH92-527-1 CRM.

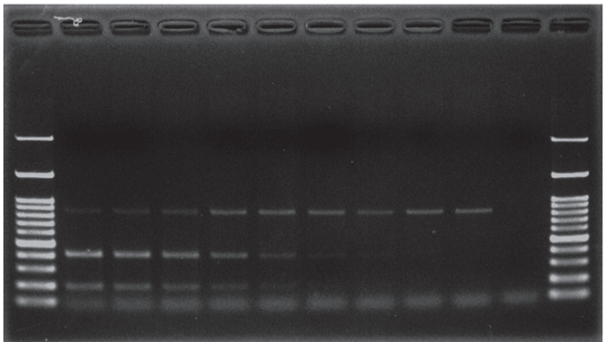


圖 5. 利用多重聚合酶鏈鎖反應同時檢測 *RNA pol* (862 bp)、*nptII* (420 bp)、anti-*GBSS* (189 bp)。以 100% 和 0% EH92-527-1 CRM 配製出不同比例的樣品進行最低可偵測濃度 (LOD) 檢測。

Fig. 5. Simultaneously detection for *RNA pol* (862 bp), *nptII* (420 bp), and anti-*GBSS* (189 bp) by means of multiplex PCR. Samples for the lowest of detection (LOD) were mixed with 100% and 0% EH92-527-1 CRM, respectively. Lane M: 100 bp DNA ladder; Lane 1: 100%; Lane 2: 75%; Lane 3: 50%; Lane 4: 25%; Lane 5: 10%; Lane 6: 5%; Lane 7: 3%; Lane 8: 1%; Lane 9: 0%; and Lane10: Negative control.

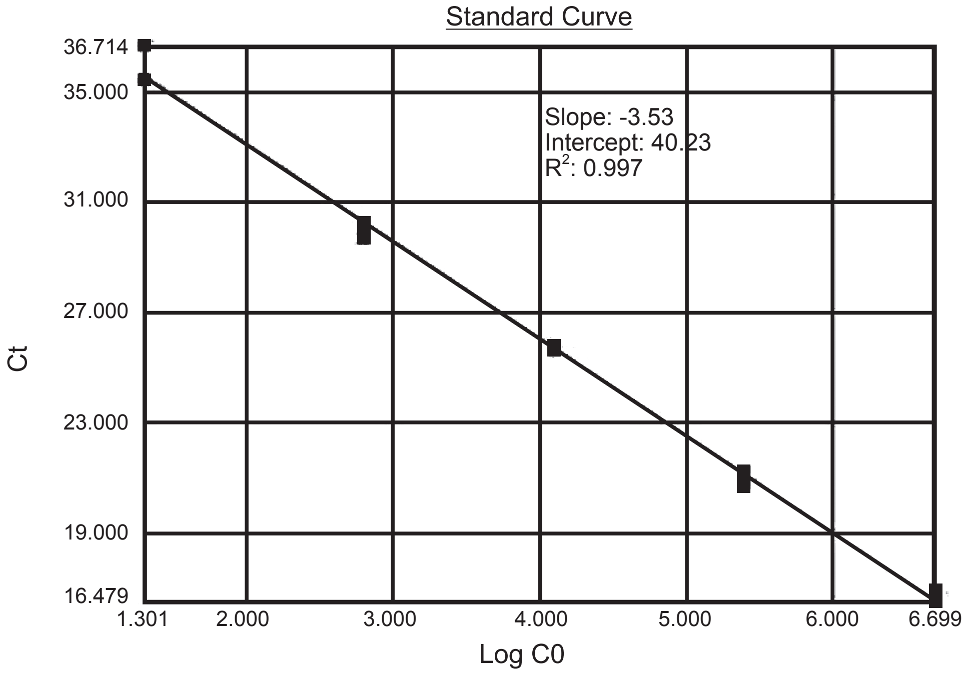
討論

當外源基因插入受體作物基因體，插入位置部分涵蓋外源基因序列部分涵蓋受體作物基因體序列，此區域為邊界序列 (flanking sequence)。由於不同品系之轉殖作物外源基因插入位置皆不相同，故可作為特定作物品系檢測標的 (Holst-Jensen *et al*. 2006)。*UGPase* 已證實為在馬鈴薯基因體中為單一插入序列拷貝 (Borovkov *et al*. 1997)，可作為馬鈴薯之物種專一性 (taxon-specific) 檢測對象外 (Watanabe *et al*. 2004)，也為良好定量對照基因。針對上述二序列於本試驗所設計之 PCR 條件以及反應下均可增幅目標片段 (*UGPase* 為 86 bp，品系專一性序列為 134 bp)，並經定序後證實為目標序列，顯示具有良好的專一性 (圖 2)。

作物基因體內可能存在與外源 T-DNA 相似基因序列，結果將導致轉殖作物檢測可能產生誤判與偽陽性的可能 (Rønning *et al*. 2003)。為增進定性檢測的準確性與節省花費、時間成本，本研究利用多重 PCR 方式以單一反應同時檢測多個目標序列，包含品系專一性序列、物種專一性等序列。然而實務上此方式之建立具有一些需克服的缺失。首先，多個目標序列在同一反應下會互相競爭；其次是每個目標序列所需要的反應條件 (例如 PCR 溫度設定與 PCR 反應化學組成，如 dNTP、$MgCl_2$ 濃度，聚合酶使用量) 均不相同。因此，試驗結果經常是有某個目標序列特別明顯，其餘顯示微弱訊號或者出現非特異性條帶。為避免上述情形發生，本試驗於設計個別目標序列時，除考慮大小需可達肉眼可分辨外，尚須考慮個別引子 Tm 值、濃度以及是否可能互相干擾。因此，我們利用不同引子濃度以及溫度梯度 PCR，找尋最佳的引子濃度與反應溫度組合，並以不同物種與品系的基因體核酸驗證本試驗方法的專一性，測試最低偵測可達 3% (w/w) (圖 5)。

一般而言，以多重 PCR 方式進行基改作物檢測，可同時得知多個目標序列，然而多重 PCR 主要進行定性試驗，無法精準定量，因此需要絕對定量試驗時，必須利用 Real-time PCR 來進行，且歐盟現行基改作物檢測方式皆以 Real-time PCR 來進行。而進行基改作物的絕對定量試驗時，常使用認證標準品 CRM 建立檢量線，但其具有許多缺點。CRM 來自於特定基改作物品系組織冷凍乾燥後研磨而得的粉末，植物體組織即存在先天上之遺傳背景異質性 (Zhang *et al*. 2011)；可購得之標準品相對重量百分比不定，對於建立定量檢量線時，無法涵蓋更寬的檢量範圍；製作與保存認證標準物質相當勞費人力與花費，又 CRM 的製備

(A)



(B)

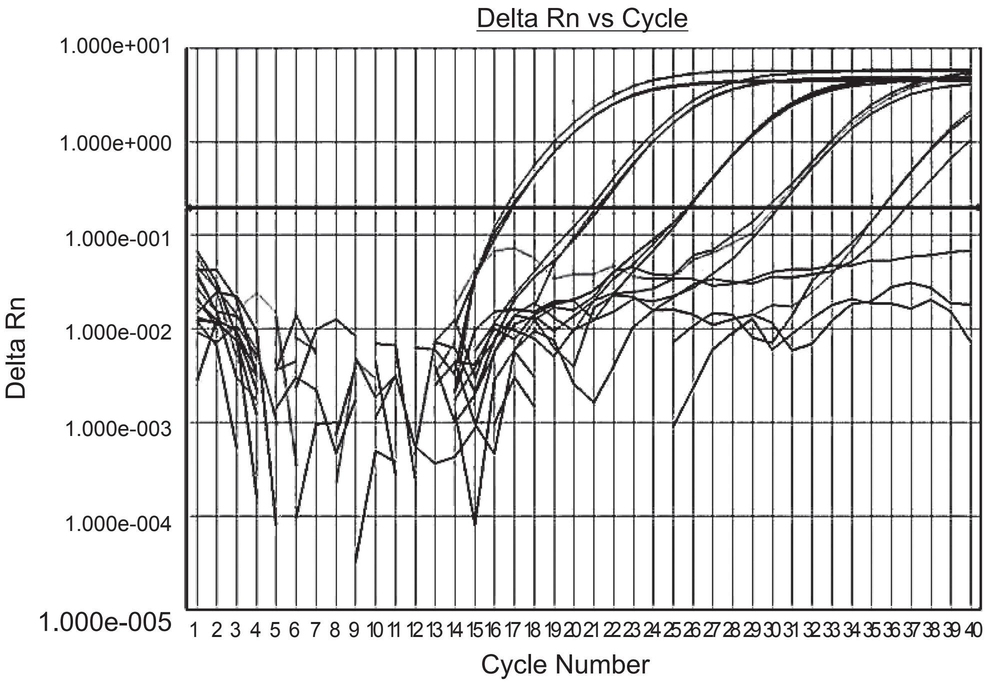


圖 6. 利用即時聚合酶鏈鎖反應偵測序列稀釋馬鈴薯內生性基因 (*UGPase*)。(A) 由質體標準物質 (pGEM-EH92) 所建構之檢量線。(B) 含 5×10^6 copies、2.5×10^5 copies、1.25×10^4 copies、6.25×10^2 copies、20 copies 質體標準物質之增幅曲線。

Fig. 6. Detection for serial dilution of taxon-specific detection for EH92-527-1 by real-time PCR. (A) Quantification curve for plasmidic reference material (pGEM-EH92); (B) Amplification curve was constructed by 5×10^6 copies, 2.5×10^5 copies, 1.25×10^4 copies, 6.25×10^2 copies, and 20 copies of plasmidic reference material (pGEM-EH92).

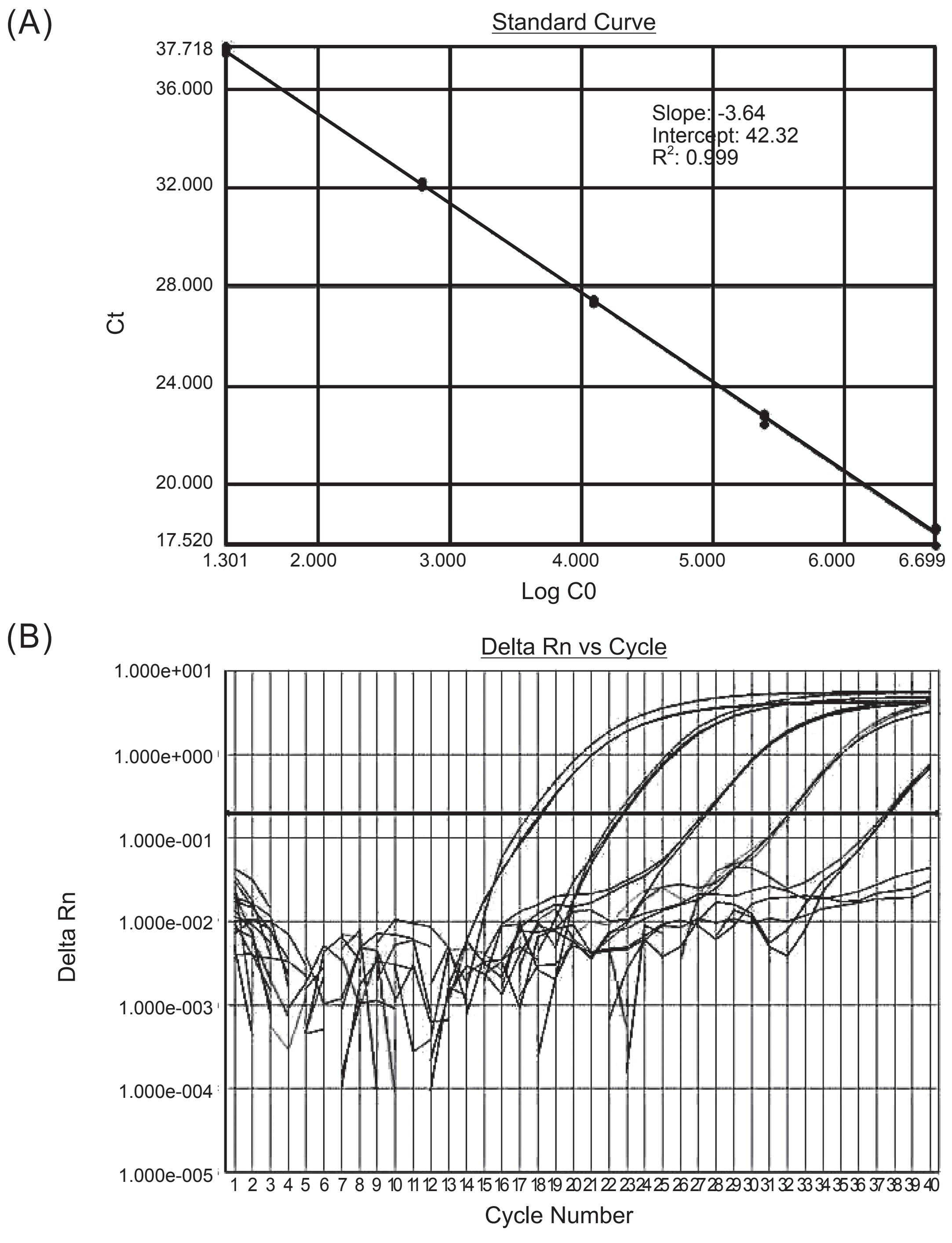


圖 7.　利用即時聚合酶鏈鎖反應偵測序列稀釋基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系專一序列。(A) 由質體標準物質 (pGEM-EH92) 所建構之檢量線。(B) 含 5×10^6 copies、2.5×10^5 copies、1.25×10^4 copies、6.25×10^2 copies、20 copies 質體標準物質之增幅曲線。

Fig. 7.　Detection for serial dilution of event-specific detection for EH92-527-1 by real-time PCR. (A) Quantification curve for plasmidic reference material (pGEM-EH92); (B) Amplification curve was constructed by 5×10^6 copies, 2.5×10^5 copies, 1.25×10^4 copies, 6.25×10^2 copies, and 20 copies of plasmidic reference material (pGEM-EH92).

表 **2.** pGEM-EH92 參考質體利用 Real-time PCR 推估之拷貝數之重複性。

Table 2. Repeatability of numbers of pGEM-EH92 from 20 to 5 × 10^6 copies per reaction for each real-time PCR.

Target	Copy No.		
	True value	Mean	RSD[z]
UGPase	20	19.13	0.10
	625	680.98	0.20
	12,500	11,829.24	0.16
	250,000	279,472.20	0.01
	5,000,000	4,659,142.00	0.04
Event-specific	20	23.02	0.25
	625	588.49	0.24
	12,500	11,239.84	0.23
	250,000	254,614.40	0.18
	5,000,000	5,473,020.00	0.12

[z] RSD: Relative standard deviation of the triplicate reaction in single experiment for each PCR system.

表 **3.** 質體參考物質 pGEM-EH92 定量方法之準確度與精準度分析。

Table 3. The accuracy and precision of results with quantitative methods using pGEM-EH92 as calibrants.

True value (%)	Accuracy		Precision	
	Mean GMO (%)	Bias True value (%)	SD[z]	RSD[y]
5	4.89	2.20	0.30	6.12
3	3.49	16.33	0.39	11.25
1	1.62	62.00	0.21	12.95

[z] SD: Standard deviation.
[y] RSD: Relative standard deviation.

是以重量百分比為單位，而利用 PCR 方式為基礎定量基改作物是以基因體套數為單位，二單位間之數學轉換仍未確定，故利用 CRM 進行基改作物定量之可靠性仍為人所質疑 (Trapmann *et al*. 2002; Taverniers *et al*. 2004)。再者，以基改大豆與玉米為例，存在於基因體中非目標序列的干擾所造成 PCR 反應效率差異，由此也影響定量結果 (Kuribara *et al*. 2002)。以上皆說明 CRM 確實仍存在使用上的疑慮，而以質體標準物質 PRM 作為取代 CRM 的使用，除製備過程簡單、花費低廉、容易保存，是同樣以基因體套數為單位。另外，只要基改作物品系序列資料可得，即可構築標準建立之檢量線，因此標準質體已認為可成為取代認證標準物質的使用 (Taverniers *et al*. 2001; Pardigol *et al*. 2003)。

本研究結果顯示，利用質體參考物質 pGEM-EH92，針對其上內源性基因 *UGPase* 以及基改馬鈴薯 EH92-527-1 品系專一性序列，以 Real-time PCR 方式分別建立檢量線與增幅曲線如圖 6、7，內源性基因 *UGPase* Ct 平均值介於 16.7 (相當於 4,659,142 拷貝數) 與 35.8 (相當於 19 拷貝數)，EH92-527-1 馬鈴薯品系專一性序列 Ct 平均值介於 18.1 (相當於 5,473,020 拷貝數) 與 37.6 (相當於 23 拷貝數)，決定係數 R^2 平均皆達到 0.99 (圖 6、7)，斜率分別為 -3.53 與 -3.64。良好的檢量線決定係數不可低於 0.98，斜率範圍需介於 -3.1 至 -3.6，由斜率換算 PCR 效率則應介於 90–110%。本研究利用 PRM 所建立之 EH92-527-1 檢量線各項數值均落於可接受範圍內，並顯示良好之 PCR 效率與線性關係，故以 pGEM-EH92 作

為檢量標準物質相當適用於基改馬鈴薯 EH92-527-1 之定量檢測 (Fraga *et al*. 2014)。

利用 PRM 建立檢量線進行基改作物的定量準確度與精準度分析部分，可以偏誤值與相對標準誤差計算結果進行評估，偏誤值越大代表定量方式準確度不佳，相對標準誤差則表示定量結果之離散程度。前人曾以基改大豆 1% Roundup Ready soybean 分析所得之偏誤值約為 4% (Zhang *et al*. 2008)，Wang *et al*. (2011) 以基改大豆 0.25–2% Roundup Ready soybean 分析所之偏誤值則介於 0.5–40%，相對標準誤差介於 3.09–18.53%。顯示利用 PRM 進行基改作物定量結果的準確度與精準度，依據個別實驗室人員操作、儀器、作物種類、使用方法等差異，而影響偏誤值與相對標準誤差數值。本研究利用 1、3 及 5% (w/w) EH-92-527-1 CRM 作為未知樣本進行測試，並計算偏誤值，如表 3，定量平均值分別為 1.6、3.5 及 4.9%，偏誤值介於 2.2–62%。本研究結果在 1% 之偏誤值過大 (達 62%)，表示本檢量方法於真值為 1% 時，檢量結果與實際值的差距甚大，結果將無法採信。依據 European Network of GMO Laboratories (ENGL) 針對基改作物定量方法所設置的標準，偏誤值應介於 ±25% 之間，合理的相對標準誤差亦應介於 ±25% 間，本研究結果相對標準誤差均落於 ±25%。綜上，本研究以質體標準物質 pGEM-EH92 建立之定量系統各重要參數均落於可接受範圍，針對 EH92-527-1 馬鈴薯品系專一性序列以及內源性基因 *UGPase* 進行定量結果皆顯示良好之應用性與再現性。

結論

台灣農業生物技術的蓬勃發展，自 1990 年代即有基改作物的相關研究，如今轉殖作物之使用更已普遍可見於人民日常生活當中，隨著近年國人對於環境、食品安全要求日漸升高，政府扮演把關與監督的角色更甚重要。以質體標準物質作為檢量標準品已應用於基改大豆、玉米與水稻 (Burns *et al*. 2006; Caprioara-Buda *et al*. 2012; Li *et al*. 2013)，本研究所建立之基改 EH-92-527-1 馬鈴薯品系之定量方式與多重聚合酶連鎖反應，除可作為實際應用於定量與定性檢測 EH-92-527-1 馬鈴薯外，亦提供未來開發其它基改作物檢測方式的參考。

引用文獻

Borovkov, A. Y., P. E. McClean, and G. A. Secor. 1997. Organization and transcription of the gene encoding potato UDP-glucose pyrophosphorylase. Gene 186:293–297.

Burns, M., P. Corbisier, G. Wiseman, H. Valdivia, P. McDonald, P. Bowler, K. Ohara, H. Schimmel, D. Charles, A. Damant, and N. Harris. 2006. Comparison of plasmid and genomic DNA calibrants for the quantification of genetically modified ingredients. Eur. Food Res. Technol. 224:249–258.

Caprioara-Buda, M., W. Meyer, B. Jeynov, P. Corbisier, S. Trapmann, and H. Emons. 2012. Evaluation of plasmid and genomic DNA calibrants used for the quantification of genetically modified organisms. Anal. Bioanal. Chem. 404:29–42.

Carter, C. A. and G. P. Gruère. 2006. International approval and labeling regulations of genetically modified food in major trading countries. p.459–480. *in*: Regulating Agricultural Biotechnology: Economics and Policy. (Just, R. E., J. M. Alston, and D. Zilberman, eds.) Springer. New York. 732 pp.

Conner, A. J., T. R. Glare, and J. P. Nap. 2003. The release of genetically modified crops into the environment. Plant J. 33:19–46.

Crespi, J. M. and S. Marette. 2003. “Does Contain” vs. “Does Not Contain”: Does it matter which GMO label is used? Eur. J. Law Econ. 16:327–344.

Fraga, D., T. Meulia, and S. Fenster. 2014. Real-time PCR. Curr. Protoc. Essential Lab. Tech. 10:10.3.1–10.3.40.

Holst-Jensen, A., M. D. Loose, and G. V. d. Eede. 2006. Coherence between legal requirements and approaches for detection of genetically modified organisms (GMOs) and their derived products. J. Agric. Food Chem. 54:2799–2809.

Hupfer, C., H. Hotzel, K. Sachse, F. Moreano, and K. H. Engel. 2000. PCR-based quantification of genetically modified Bt maize: Single-competitive versus dual-competitive approach. Eur. Food Res. Technol. 212:95–99.

Kuribara, H., S. Yoichiro, M. Takeshi, T. Ken, F. Satoshi, A. Nobutaro, H. Takashi, A. Hiroshi, G. Yukihiro, T. Masatake, and H. Akihiro. 2002. Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. J. AOAC Intl. 85:1077–1089.

Li, L., X. Zhang, Y. Wan, and W. Jin. 2013. Development of a novel reference plasmid for accurate quantification of genetically modified kefeng6 rice DNA in food and feed samples. Biomed. Res. Intl. 2013:1–7.

Lipp, M., A. Bluth, F. Eyquem, L. Kruse, H. Schimmel, G. V. d. Eede, and E. Anklam. 2001. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. Eur. Food Res. Technol. 212:497–504.

Pardigol, A., S. Guillet, and B. Pöpping. 2003. A simple procedure for quantification of genetically modified organisms using hybrid amplicon standards. Eur. Food Res. Technol. 216:412–420.

Rønning, S. B., M. Vaïtilingom, K. G. Berdal, and A. Holst-Jensen. 2003. Event specific real-time quantitative PCR for genetically modified Bt11 maize (*Zea mays*). Eur. Food Res. Technol. 216:347–354.

Shindo, Y., H. Kuribara, T. Matsuoka, S. Futo, C. Sawada, J. Shono, H. Akiyama, Y. Goda, M. Toyoda, and A. Hino. 2002. Validation of real-time PCR analyses for line-specific quantitation of genetically modified maize and soybean using new reference molecules. J. AOAC Intl. 85:1119–1126.

Taverniers, I., E. V. Bockstaele, and M. D. Loose. 2004. Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: Different real-time duplex quantitative PCR methods. Anal. Bioanal. Chem. 378:1198–1207.

Taverniers, I., P. Windels, E. V. Bockstaele, and M. D. Loose. 2001. Use of cloned DNA fragments for event-specific quantification of genetically modified organisms in pure and mixed food products. Eur. Food Res. Technol. 213:417–424.

Trapmann, S., H. Schimmel, G. N. Kramer, G. V. d. Eede, and J. Pauwels. 2002. Production of certified reference materials for the detection of genetically modified organisms. J. AOAC Intl. 85:775–779.

Wang, X., D. Teng, Y. Yang, F. Tain, Q. Guan, and J. Wang. 2011. Construction of a reference plasmid molecule containing eight targets for the detection of genetically modified crops. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90:721–731.

Watanabe, T., H. Kuribara, T. Mishima, H. Kikuchi, T. Kodama, S. Futo, K. Kasama, A. Toyota, M. Nouno, A. Saita, K. Takahashi, A. Hino, H. Akiyama, and T. Maitani. 2004. New qualitative detection methods of genetically modified potatoes. Biol. Pharm. Bull. 27:1333–1339.

Zhang, H., L. Yang, J. Guo, X. Li, L. Jiang, and D. Zhang. 2008. Development of one novel multiple-target plasmid for duplex quantitative PCR analysis of roundup ready soybean. J. Agric. Food Chem. 56: 5514–5520.

Zhang, N., W. Xu, W. Bai, Z. Zhai, Y. Luo, X. Yan, J. He, and K. Huang. 2011. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of LY038 maize in mixed samples. Food Control 22:1287–1295.

Development of Detection and Quantification Methods for Transgenic Potato Using Multiplex PCR and Plasmidic Reference Material

Yuan-Kai Tu[1], Yu-Wei Feng[2], Min-Tze Wu[3], Shi-Yu Wang[2], Shu Chen[4], and Han-Wei Chen[1,*]

Abstract

Tu, Y. K., Y. W. Feng, M. T. Wu, S. Y. Wang, S. Chen, and H. W. Chen. 2016. Development of detection and quantification methods for transgenic potato using multiplex PCR and plasmidic reference material. J. Taiwan Agric. Res. 65(1):18–30.

The objectives of this research were to establish a new quantification method and a fast multi-target PCR method for genetically modified potato event, EH92-527-1. A plasmidic reference material (PRM), pGEM-EH92, was constructed and used as a calibrant to quantify content of EH92-527-1. Results showed the lowest of quantification was 0.1% (w/w), bias and relative standard error were 16.3% and 6–12.9%, respectively, at 3% (w/w) true value. It indicated that the quantification method by means of PRM was able to practically determine the EH92-527-1 event content of mixed sample above 3%. When *RNApol* (RNA polymerase), *nptII* (Neomycin phosphotransferase II) and antisense *GBSS* (Granule bound starch synthase) sequences of EH92-527-1 event were used as multiplex PCR target, the lowest of qualification of multiplex PCR method was 3%.

Key words: Genetically modified, Potato, Real-time PCR, Plasmidic reference material.

Received: December 16, 2014; Accepted: June 8, 2015.
* Corresponding author, e-mail: swaychen@tari.gov.tw
1 Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Research Assistants, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
3 Research Fellow and Director, Plant Technology Laboratories, Agricultural Technology Research Institute, Hsinchu, Taiwan, ROC.
4 Associate Research Fellow, Plant Germplasm Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 65(1):31–44 (2016)
DOI: 10.6156/JTAR/2016.06501.04

研究報告

應用分子輔助回交選育稉稻多粒數品系之探討

賴明信[1] 李長沛[2] 卓緯玄[2] 顏信沐[2] 胡凱康[3] 吳東鴻[2,*]

摘要

賴明信、李長沛、卓緯玄、顏信沐、胡凱康、吳東鴻。2016。應用分子輔助回交選育稉稻多粒數品系之探討。台灣農業研究 65(1):31–44。

水稻粒數屬於數量性狀且無法於生育早期進行選拔，並需透過重複性田間試驗才能估計選拔效應；對此，為了加強秈、稉稻間的產量基因聚合效率並驗證目標基因座的效益，本試驗利用分子輔助回交法，將多粒數對偶基因 (Ha-*Gn1*) 由秈稻 'Habataki' 導入國內具有良好食味的稉型稻「台農 71 號」('Tainung 71' or 'TNG71') 中，藉以評估該基因在台灣品種背景下之產能效益。近同源系選育過程中，分別使用位在 *Gn1* 基因座旁 6 個連鎖標幟作為前景選拔使用，另背景選拔共分析 152 個 SSR 與 InDel 標幟使其標幟間距可達 10.8 cM。基因型分析結果顯示，除了第 1 號染色體短臂上帶有 *Gn1* 基因座約 30 cM 的長度外，該 BC_3F_2 後裔台農 71 號 *Gn1* 品系 (TNG71-*Gn1*) 已大多回復為「台農 71 號」的遺傳背景；而該植株的外觀農藝性狀，舉凡抽穗期、穗數與株高等均與輪迴親「台農 71 號」相似，僅每穗粒數較「台農 71 號」提升了 26%，由 105.2 (± 37.4) 增加為 133.1 (± 61.9) 粒。此外，另採用「台農 71 號」第 1 號染色體階層片段置換系，進一步觀察同在第 1 條染色體短臂區域上的粒數基因中 *Gn1a*、*Gn1b* 基因座與其 2 次枝梗數基因座 *qSBN1* 對於穗形結構與穎花數的關係。結果顯示，*Gn1a* 多粒數基因座並不影響 1 次枝梗粒數，主要係提升 2 次枝梗粒數且增加 2 次枝梗平均粒數，而非全面性提升每穗所有枝梗上的粒數。另上游區間 *Gn1b* 基因座，則係影響 2 次枝梗數，使得每穗粒數增加。藉此亦顯示，2 次枝梗數基因座 *qSBN1* 可細分為 2 個子基因座，對 2 次枝梗數的影響分別在兩親本間可達 38.4% 與 11.7%。上述成果，將有助稻作產能相關聚合育種以及穗形結構之選育基礎，應用分子輔助育種提升我國稻作產能。

關鍵詞：水稻、粒數、分子輔助回交、產量。

前言

稻作產量構成涵蓋每株穗數、每穗粒數、稔實率與千粒重等要素，若能提升任一性狀均對產能具有正面效應，其中以每株穗數及每穗粒數影響尤甚 (Lin 1990)。然分蘗數過多容易造成下位葉的遮蔽效應，穀粒過大則易導致心腹白比例過高，故以提升粒數作為增產潛力初步目標。每穗粒數屬於數量性狀且無法於生育早期進行選拔，並需透過重複性試驗設計才能估計選拔效應。另產量性狀在早期世代的遺傳率不高、選拔效率不彰，甚至須花費龐大人力、物力等田間試驗資源在後裔檢定上。過去 20 年來，數量性狀基因座 (quantitative trait locus; QTL) 定位分析已經廣泛應用在各類水稻種原上，探索產量等重要農藝性狀，且已發現一系列與產量性狀基因座，並藉由據圖選殖策略挖掘出相關調控基因；例如，*Gn1a* 基因座係控制每穗粒數的基因座，亦發現該基因座編碼細胞分裂素氧化酶 (*OsCKX2*) (Ashikari *et al*. 2005)。除了 *Gn1a* 基因座外，也陸續發掘

投稿日期：2015 年 5 月 20 日；接受日期：2015 年 6 月 30 日。
* 通訊作者：dhwu@tari.gov.tw
1 農委會農業試驗所作物組副研究員。台灣 台中市。
2 農委會農業試驗所作物組助理研究員。台灣 台中市。
3 國立台灣大學農藝學系副教授。台灣 台北市。

出 *DEP1* (Huang *et al*. 2009)、*WFP* (Miura *et al*. 2010)、*APO1* (Ikeda *et al*. 2007; Terao *et al*. 2010) 與 *OsSPS1* (Hashida *et al*. 2013) 等均有助提升每穗枝梗數，而有關穀粒長度、寬度及充實能力等相關基因亦被挖掘出來 (Song *et al*. 2007; Shomura *et al*. 2008; Wang *et al*. 2008)。為了顯著提高產能，也有學者提出藉由堆疊多個有益基因的選育策略，亦已有了建立相關產量基因選育模式的具體成果 (Ashikari & Matsuoka 2006; Ando *et al*. 2008; Ohsumi *et al*. 2011)，並確認該基因的產能效益將日漸重要。

增加穎花數係提升產量的另一項最直接途徑，若能最佳化穗部內各構成要素間的平衡關係將有助提升穎花數，其中穎花數又與各級枝梗數與枝梗著粒密度息息相關。前人利用 ‘Habataki’/‘Koshihikari’ 中 96 個 BC_1F_6 後裔進行每穗粒數 QTL 定位分析，發現到第 1 號染色體短臂上 *Gn1* 基因座具有 44% 變異解釋量。再進一步利用 Koshihikari-*Gn1* 近同源系進行精細定位，發現 *Gn1* 區間中可細分為 *Gn1b* 基因座與 *Gn1a* 基因座，且兩者對於粒數貢獻效應彼此相當，也完成將 *Gn1a* 基因座精簡至 2 cM 以內與據圖選殖分析 (Ashikari *et al*. 2005)。在穗形結構上，於 2008 年每穗小枝梗數研究中曾利用 ‘Sasanishiki’/‘Habataki’ 組合上的 39 個染色體片段置換系品系，發掘出分別位於第 1 號染色體短臂上的 2 次枝梗數基因座 *qSBN1*，以及第 6 號染色體上的 1 次枝梗數座 *qPBN6* 等兩主效基因座，分別能提升 2 次枝梗數與 1 次枝梗數進而增加穎花數 (Ando *et al*. 2008)。然 2 次枝梗數基因座 *qSBN1* 與 *Gn1* 粒數基因座相互重疊，該區間有助提升穎花數與 2 次枝梗數，惟 *Gn1a*、*Gn1b* 與 *qSBN1* 基因座 3 者間對於各級枝梗數與枝梗著粒密度的相互關係，仍待進一步確認。

梗稻與秈稻兩亞種在產量構成要素以及外觀株型上具有不同形態特徵，梗稻具有較佳株型與劍葉形態，秈稻多為穗大、籽粒多、葉片寬大且長而下垂。近年來日本、韓國、中國大陸及國際稻米研究所利用不同生態型亞種間雜交，融合兩方優點認為比品種間的雜種較具有生物學優勢 (Peng *et al*. 2008)，亦具擴大遺傳多樣性的優點。然而，秈稉雜交時常受到諸多因素的干擾不易選拔，諸如：雜交後裔穩定性較差、籽粒充實不良及生育期太長等瓶頸，而且秈、稉稻雜交後裔面臨高度分離，必須維持更高選拔族群數才得以獲得優良後裔。

本研究為了加速兩亞種間高產能基因滲入並維持優良米質背景，擬開發多粒數 *Gn1a* 多粒數功能性標幟作為前景選拔，並搭配全基因組 InDel 標幟進行背景選拔，將秈稻多粒數基因回交轉移至國內良質米品種中，評估多粒數基因座 *Gn1* 的產能貢獻程度。另將在第 1 條染色體短臂區域上，採用階層式逐步增減提供親片段的模式，加強目標區間內 QTL 的定位解析能力，便於重複評估 QTL 效應，並進一步確認同一區間上粒數基因中 *Gn1a*、*Gn1b* 基因座與其 2 次枝梗數基因座 *qSBN1* 對於穗形結構與穎花數的關係，作為日後稻作產能以及穗形結構之選育基礎。

材料與方法

試驗材料

本試驗回交後裔以稉稻「台農 71 號」為輪迴親，以日本秈稻品種 ‘Habataki’ 作為提供親；其中「台農 71 號」自 2000 年命名以來，皆被列為全台前十大優良推薦品種，具有芋頭香味、米質優良、株型良好等優點。但其生育期、產量略低於豐產品種，抽穗後期老化速度快且易倒伏。秈稻 ‘Habataki’ 係於 1989 年命名，係日本北陸農業試驗場因執行「超多收作物之開發與栽培技術確立」相關農業政策 (1981–1988 年) 育成具超高產特性之秈稻品種。該品種為極穗重型品種，屬於多粒數基因型以 Ha-*Gn1* 符號代表，稈長約 78 cm、耐倒伏且具中等穗上發芽耐受性，且生育後期老化慢、光合作用效率強 (Kobayashi *et al*. 1990)。

台農 71 號 *Gn1* 品系選育係以輪迴親「台農 71 號」為父本，提供親 ‘Habataki’ 為母本，在 2008 年第 2 期作建立雜交組合，連續經過 3 次回交與 1 次自交，產生 BC_1F_1、BC_2F_1、BC_3F_1 與 BC_3F_2 後裔。其後每一世代均在溫室

中先經過 *Gn1a* 功能性標幟與 5 個連鎖標幟進行前景選拔挑選目標基因型，與 152 個全基因組標幟作為背景選拔，每一世代均針對上一世代尚未回復成輪迴親的染色體區間進行篩檢，並挑選遺傳背景具有「台農 71 號」比例最高前 3 者進行回交避免雜交失敗 (圖 1)。

「台農 71 號」第 1 號染色體置換系與其階層片段置換系選育，則由上述 BC_1F_1 後裔中挑選具有第 1 號染色體完整程度最高者為目標，反覆進行回交提高背景回復率，直至 BC_3F_2 世代挑選出第 1 號染色體置換系 TARI71_1。續針對第 1 號染色體短臂前約 30 cM 長的區域，在 $BC_3F_{2:3}$ 世代中挑選 4 個品系依序置換不等提供親染色體片段的品系，分別遞增「台農 71 號」短臂片段終至粒數基因座 *Gn1a*，命名為 TARI71_1_1 至 TARI71_1_4 等 4 個品系，用以評估該區間上目標基因座對於穗形結構與穎花數的關係 (圖 2)。

專一性標幟設計與核酸分析

本試驗用以前景選拔粒數之功能性標幟，係針對文獻所示 *Gn1a* 基因座 5'UTR 區域上

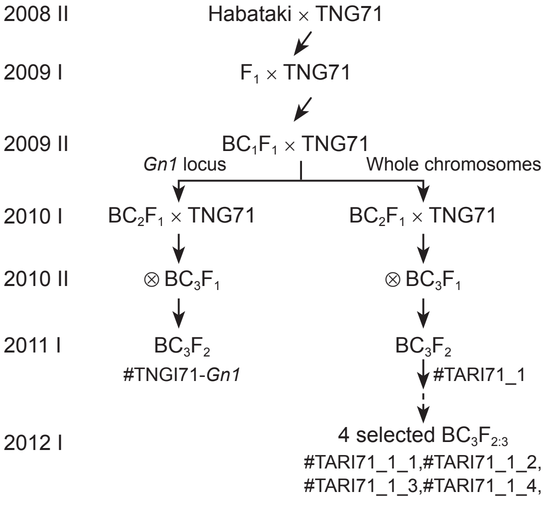


圖 1. 運用分子輔助回交選育將 'Habataki' 的 *Gn1* 片段與第 1 號染色體上各不同染色體片段長度導入「台農 71 號」中之選育流程圖。

Fig. 1. The breeding scheme of introgression of *Gn1* and different segment lengths of chromosome 1 from 'Habataki' to 'Tainung 71' by marker-assisted backcross selection.

16 bp 的 InDel 多型性 (Ashikari *et al*. 2005)，由水稻基因註解資料庫 (The Rice Annotation Project Database; RAP-DB) 下載稉稻 *Gn1a* 基因座上所編碼 *OsCKX2* 序列 (Os01g0197700)，另至美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information) 下載該基因坐落第 1 條染色體之 BAC 序列 (AP003200)，匯入 BioEdit 編輯軟體 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA) 進行序列排列後，藉由 Primer Premier 5 軟體 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) 引子設計軟體設計專一性引子。而監控背景回復率所需 InDel 標幟，則參考 Wu *et al*. (2013) 全基因組 InDel 套組，並在部分長距離區間中增補 SSR 標幟加強選拔。專一性引子與輔助背景選拔標幟，均經兩親本「台農 71 號」與 'Habataki' 多型性篩選，而為使多型性標幟在全基因組能均勻分布，將所得多型性標幟利用 BLAST 套件將其引子序列對應至所屬 PACs/BACs 確認 IRGSP (International Rice Genome Sequencing Project) 網站 Build 5 版的物理圖譜位置，再依 IRGSP 網站 Build 5 所公布各染色體上 PACs/BACs 對應於 'Nipponbare'/'Kasalath' 遺傳圖譜資訊 (Harushima *et al*. 1998; IRGSP 2005)，將所有多型性標幟的物理位點轉換成遺傳圖譜位置，便於推估分子標幟間可能的遺傳距離、有效監控遺傳重組區間。遺傳背景回復率估算則以植株整體攜有輪迴親遺傳距離總長之百分比為基礎，其中由各分子標幟所坐落相鄰區間之平均長度累計輪迴親遺傳總長，並視輪迴親同質結合體基因型或異質結合體基因型分別給予加權係數 1 或 0.5 進行統計。

葉片基因組 DNA 萃取如 Wu *et al*. (2013) 所描述；PCR 的反應條件為 94℃ 2 min；94℃ 30 s、55℃ (依黏合溫度最佳化測試結果可改為 50℃或 60℃) 20 s、72℃ 30 s，循環 2 次；94℃ 20 s、55℃ (50℃或 60℃) 15 s、72℃ 20 s，循環 30 次 (因不同分子標幟的擴增效率不同，將正負加減 2 次循環)；72℃ 3 min；反應結束後以 4℃保存擴增產物。PCR 產物進行電泳分析時，為提高膠體上之電泳功率，僅讓電泳液與膠體兩端接觸即可，避免 1× 電泳緩衝液淹

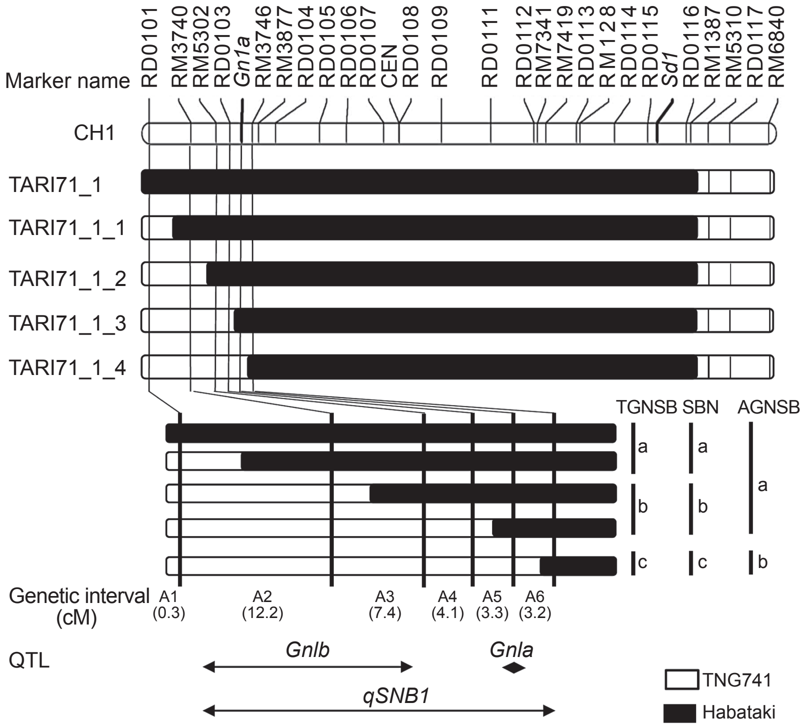


圖 2. 圖解「台農 71 號」第 1 號染色體置換系與其階層片段置換系之遺傳組成，並在 2 次枝梗總粒數、2 次枝梗數與 2 次枝梗平均粒數上以相同字母代表品系間不具顯著差異。

Fig. 2. Graphical genotypes of the ‘TNG71’ stepped aligned inbred recombinant lines on chromosome 1. Means within TGNSB, SBN and AGNSB followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher’s protected LSD test.

沒膠體，於 26 cm × 26 cm 之 3% Agarose I 膠體上以 350 伏特 (15 V cm^{-1}) 進行電泳。

產量與農藝性狀評估

稻穀產量評估試驗在行政院農業委員會農業試驗所水稻試驗田進行，其中台農 71 號 *Gn1* 多粒數品系產能評估，以「台農 71 號」與 ‘Habataki’ 兩雜交親本為對照品種，在 2011 年第 2 期作進行 2 重複 4 行區，每小區種植 100 株，行株距 30 cm × 15 cm (小區面積為 4.5 m^2)。栽培期間使用硫酸銨及台肥複合肥料 39 號，試區氮素施用量達 120 kg ha^{-1}，施用量分為 1 次基肥、2 次追肥及穗肥共 4 次平均施用。磷酐施用量係 72 kg ha^{-1}，在基肥 1 次施用；氧化鉀施用量達 48 kg ha^{-1}，以基肥及穗肥施用。病蟲害防治及其他田間管理，則依一般慣行法實施。小區稻穀產量係機械脫粒並經 1 次風選後，記錄乾穀重量及含水量，再以穀粒水分含量 13% 為基準估算單位面積產量。產量構成要素，係每小區取樣 4 株進行考種調查。另每株取最高 3 穗主穗，供後續主要強勢穗上的粒數調查。各性狀多重比較檢定，係採 Fisher 的最小顯著差異性測驗 (Fisher’s protected least significant difference test; LSD test)，進行所有處理平均值間的兩兩比較。

「台農 71 號」染色體置換系與其階層片段置換系，在 2012 年第 2 期作進行品系培育，分別移植「台農 71 號」第 1 號染色體置換系 TARI71_1 與另外 4 個不等片段置換系，品系移植作業與田間栽培管理均同上述調查。每品系均種植 3 行區、每行 10 株，性狀調查以中間行 8 株為主，待成熟期後每株取 3 穗主穗供後續目標性狀調查。調查性狀包括每穗粒數、1 次枝梗總數、2 次枝梗總數、1 次枝梗總粒數、2 次枝梗總粒數、1 次枝梗平均粒數與 2

次枝梗平均粒數，性狀統計分析亦以 Fisher 的最小顯著差異性測驗進行多重比較。

結果

全基因組多型性標幟篩檢

由已開發的 506 個 InDel 標幟 (Wu *et al*. 2013)，在「台農 71 號」與 'Habataki' 間全基因組篩選獲得 118 個 InDel 多型性標幟，另再使用 39 個 SSR 標幟填補部分較大間距的區間。為推估各分子標幟的遺傳間距，以期有效監控各區間發生遺傳重組的狀況，依所有標幟的物理位點標註其所坐落的 BAC，再採該標幟之 BAC 對應於已知 'Nipponbare'/'Kasalath' 連鎖圖譜之相對遺傳位點。結果顯示，整體基因組平均每標幟間距 10.8 cM 遺傳距離，而物理距離約為 2.6 Mb，最大區間於第 6 條染色體約為 26 cM。在多粒數基因座 *Gn1a* 前景選拔，本試驗自行開發 Gn1a 功能性專一性標幟 (F: 5'-CCTGCTCTTGCTTCATTATC-3', R: 5'-CACCTTGTCCCTTCTACAAT-3')，另搭配 RD0101、RM3740、RM5302、RD0103 與 RM3746 等 5 個分子標幟分別均勻散布第 1 條染色體短臂上。用以偵測輪迴親回復程度之背景選拔標幟，則使用上述 152 個 InDel 與 SSR 標幟廣泛分布於全基因組上，其平均遺傳距離小於 12.5 cM (圖 3)。

導入系輔助選育歷程

多粒數品系台農 71 號 *Gn1* 選育過程分述如下：於 2008 年第 2 期作建立雜交組合，隔年第 1 期作繁殖種植 30 株 F_1 後裔用以生產回交族群，均經 *Gn1a* 功能性標幟與兩側連鎖標幟確認 F_1 單株。2009 年第 2 期作培育 98 株 BC_1F_1 回交後裔，先經過前景選拔篩選出 50 株攜有目標基因之植株後，並將 152 個分子標幟分成 3 階段作為背景逐步篩選。第 1 階段先以平均區間 30 cM 粗略區間為篩選基礎，先以 61 個分子標幟確認 50 株目標植株的遺傳背景，第 2 階段再取出前 10 株攜有較多輪迴親背景者，提高篩選密度再補充 61 個分子標幟之遺傳組成，達成篩選區間長度仍維持 12.5 cM。首先挑選出背景回復率前 3 高者生產 BC_2F_1 回交種子，針對這 3 株已生產回交後裔的植株再分析 30 組 SSR 標幟加強確認遺傳背景，該世代分析反應數約 4,338 組，而最終考量較多回交種子數與背景回復率者，選出單株背景回復率達 67.4% 者，供世代推進及背景回復率的計算。2010 年第 1 期作培育 60 株 BC_2F_1 回交後裔，亦先經過前景選拔後，獲得其中 32 株再經上一代未回復為輪迴親的 97 個分子標幟進行背景回復率分析，挑選出目標植株生產 BC_3F_1 回交種子，該世代分析反應數約 3,464 個。淘汰雜交種子數不足者，再選出單株背景回復率達 81.9% 者供下一世代備用。2010 年第 2 期作培育 60 株 BC_3F_1 回交後裔，重複上述篩選步驟後，再經尚未回復輪迴親背景 47 個分子標幟進行背景回復率分析，挑選出目標植株生產 BC_3F_2 自交種子，該世代分析反應數約 1,676 個，又從整體平均背景回復率為 87.4% 中挑選出最佳單株者 (背景回復率達 92.6%)。而 2011 年第 1 期作培育 150 株 BC_3F_2 分離後裔，亦經前景選拔與背景選拔等階段分析固定「台農 71 號」近同源系之遺傳背景，基因型分析規模達 1,500 個。最後，同時考量攜有目標基因與株高、劍葉等優良株型下選出台農 71 號 *Gn1* 多粒數品系，2011 年第 2 期作進行產量觀察試驗 (表 1)。

「台農 71 號」第 1 號染色體置換系與其階層片段置換系選育，則由上述 2009 年第 2 期作 BC_1F_1 後裔中挑選具有第 1 號完整染色體者，反覆進行回交提高背景回復率，直至 2011 年 BC_3F_2 世代挑選出第 1 號染色體置換系 TARI71_1，僅長臂端點處長約 24.6 cM 已在世代推進中遺失。再針對第 1 號染色體短臂前約 30 cM 長的區域，分別以 2 個 InDel 標幟 RD0101 與 RD0103、3 個 SSR 標幟 RM3740、RM5302 及 RM3746 與 *Gn1a* 粒數功能性標幟，可將該區域再細分為 A1–A6 等 6 個區間。分別選育在 A1 至 A6 區間中發生置換片段長度不等的染色體片段置換系，在 BC_3F_2 世代中挑選 4 個品系依序置換不等提供親染色體片段且維持異質結合體狀態，但長臂等區域均固定提供親組成呈現同質結合體狀態者，2012 年第一期作各置換族群在 $BC_3F_{2:3}$

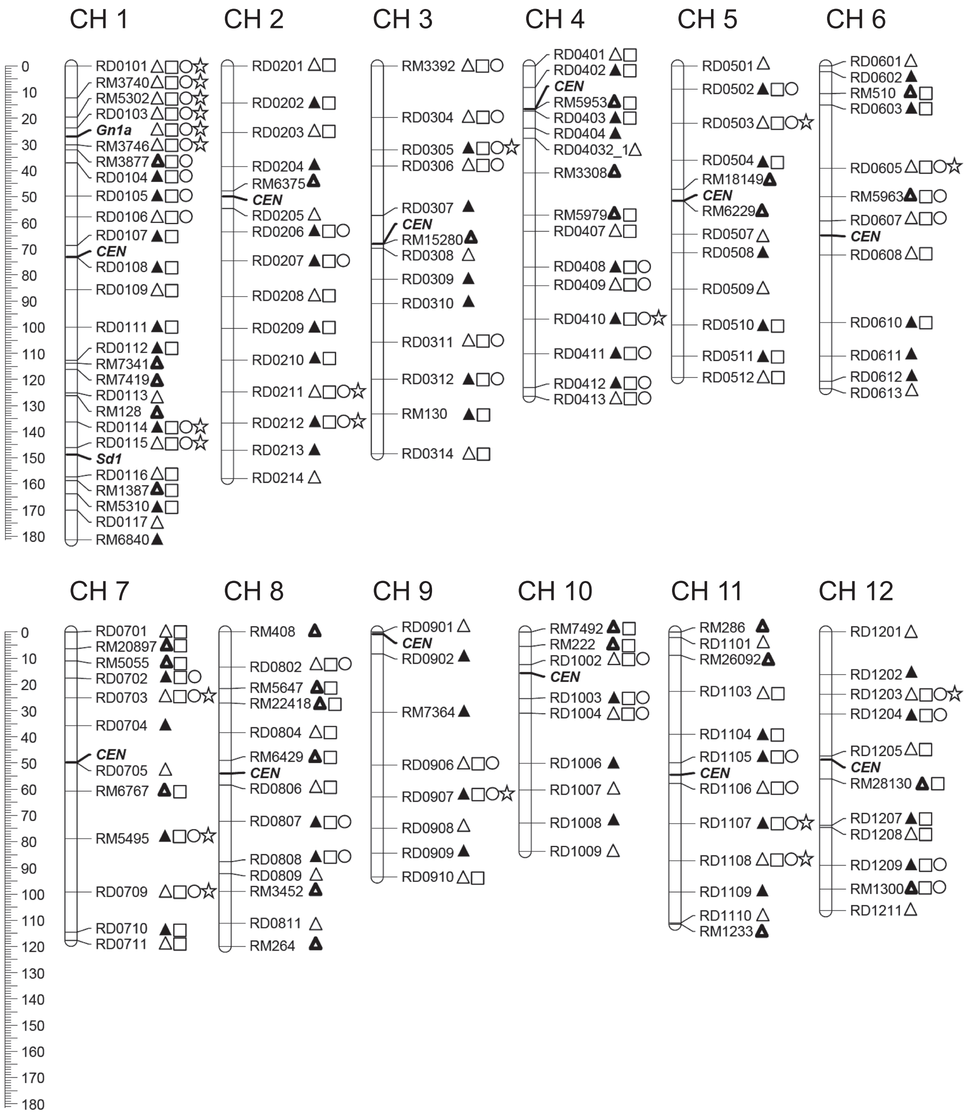


圖 3. 本試驗在「台農 71 號」與 'Habataki' 間親本多型性使用 118 個 InDel 與 39 個 SSR 標幟，而各標幟遺傳位點則利用所有分子標幟的引子序列所坐落的 PACs/BACs，將其物理位點歸納至 IRGSP 網站上所示各 PACs/BACs 在 'Nipponbare'/'Kasalath' 遺傳圖譜上。各標幟字頭分別以 RD 與 RM 代表 InDel 以及 SSR 標幟。其中台農 71 號 *Gn1* 品系各世代選育所使用標幟分別以三角形、方形、圓形以及星形代表 BC_1F_1、BC_2F_1、BC_3F_1 與 BC_3F_2 世代，而 BC_1F_1 世代中第 1、2 及 3 階段篩選標幟又以白色、黑色與黑粗邊區分。

Fig. 3. Parental polymorphism survey identified 118 InDel and 39 SSR polymorphic markers between 'TNG71' and 'Habataki'. All markers were assigned to the linkage map of 'Nipponbare'/'Kasalath' based on the primer sequences of markers by blasting against PACs/BACs, which were integrated to the linkage map by IRGSP. The prefixes RD and RM indicated InDel and SSR markers, respectively. Different marker symbols indicated by triangles, squares, circles and stars were applied to BC_1F_1, BC_2F_1, BC_3F_1, and BC3F_2 generation of TNG71-*Gn1*, respectively. The three triangle colors indicated by white, black and black edge were applied for the first, second and third step of BC_1F_1 background selection.

世代均種植 24 株。最後從中挑選已置換回復成「台農 71 號」組成的品系，依序遞增「台農 71 號」短臂片段終至粒數基因座 *Gn1a*，命名為 TARI71_1_1 至 TARI71_1_4 等 4 個品系 (圖 2)。

表 1.　多粒數品系台農 71 號 *Gn1* 選育歷程與各世代篩選規模。

Table 1.　The experimental scale to develop the 'TNG71' near-isogenic lines carrying high grain number *Gn1* allele in each generation.

Season	Generation	Background recover rate	Population size	Genotyping assay[z]		
				Foreground	Background	Total
2008 2nd	Crossing	-	Each 30	-	-	-
2009 1st	F_1	-	30	90	-	90
2009 2nd	BC_1F_1	67.4%	98	588	3,750	4,338
2010 1st	BC_2F_1	81.9%	60	360	3,104	3,464
2010 2nd	BC_3F_1	92.6%	60	360	1,316	1,676
2011 1st	BC_3F_2	98.0%	150	900	600	1,500
2011 2nd	Yield trial	-	-	-	-	-

[z] Foreground: foreground selection reaction; background: background selection reaction; total: total reaction.

多粒數品系農藝特性與產能評估

多粒數品系台農 71 號 *Gn1*，於 2011 年第 2 期作稻穀產能評估試驗中，全生育日數為 104 d 與輪迴親「台農 71 號」相同，較提供親 'Habataki' 延後 4 d。在每穗粒數上達 133.1 粒，而主要強勢穗上平均粒數為 220.3 至 267.0 粒，然「台農 71 號」僅每穗平均具 105.5 粒，其主要強勢穗上平均粒數為 180.0 至 175.7 粒，顯示在目標性狀上獲得顯著遺傳增進。台農 71 號 *Gn1* 品系在每公頃產量上僅獲得 5,536 kg，相較於「台農 71 號」 (5,312.2 kg ha^{-1}) 只提升產能 4.2%。回顧產量構成要素，可見台農 71 號 *Gn1* 品系的平均穗數 15.8 穗，千粒重 (23.77 g)、粒長 (2.13 cm) 與粒寬 (0.35 cm) 等均與「台農 71 號」相近，歸咎主因係充實率不佳只達 63–65.6% (表 2)。在株高與穀粒外觀上，台農 71 號 *Gn1* 株高由 109.1 cm 下降至 104 cm，稻穀平面積為 0.2 cm^2 與「台農 71 號」(0.22 cm^2) 相似 (表 2、圖 4)。

「台農 71 號」階層片段置換系粒數性狀評估

「台農 71 號」第 1 號染色體置換系 (TARI71_1) 攜有 'Habataki' 粒數 *Gn1* 與半矮性 *Sd1* 基因，主穗平均粒數可達 202.1 粒。另在穗形結構上可見 1 次、2 次枝梗數各為 9.6 與 45.4 枝，而各枝梗類型上平均粒數分別為 5.37 與 3.36 粒 (表 3)。而品系 TARI71_1_1 至 TARI71_1_4，則是隨著置換「台農 71 號」片段長度增加，可見主穗平均粒數、2 次枝梗數與 2 次枝梗平均粒數均呈現下降趨勢，主穗平均粒數由 207.8 粒下降至 138.1 粒，其中 1 次枝梗數 (9.6–9.2 枝) 與 1 次枝梗粒數 (5.75–5.37 粒) 均穩定維持相近狀態。然觀察品系間主穗平均粒數下降幅度較大，分別出現在品系 TARI71_1_3 以及 TARI71_1_4 上，在品系 TARI71_1_2 已因每穗 2 次枝梗數由 45.4 減少為 41.9 枝，使得主穗平均粒數減少為 194.2 粒，品系 TARI71_1_3 與品系 TARI71_1_1 相

表 2.　台農 71 號 *Gn1* 多粒數品系 2011 年第 2 期作產量構成要素與生育特性。

Table 2.　Comparisons of heading date, yield, and yield components between TNG71-*Gn1* and its parents. Data was collected in the second cropping season in 2011.

Variety (line)	Maturity days	Plant height (cm)	Panicle number	Spikelet/ panicle	Spikelet fertility (%)	1000-grain weight (g)	Estimated yield (kg ha^{-1})
Habataki	100 b[z]	97.7 b	14.2 ab	140.8 a	72.8 b	21.6 b	5,816.3 a
TNG71-*Gn1*	104 a	104.0 ab	15.8 a	133.1 b	64.7 c	23.8 a	5,536.0 b
TNG71	104 a	109.1 a	12.7 b	105.5 c	78.8 a	23.9 a	5,312.2 b

[z] Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

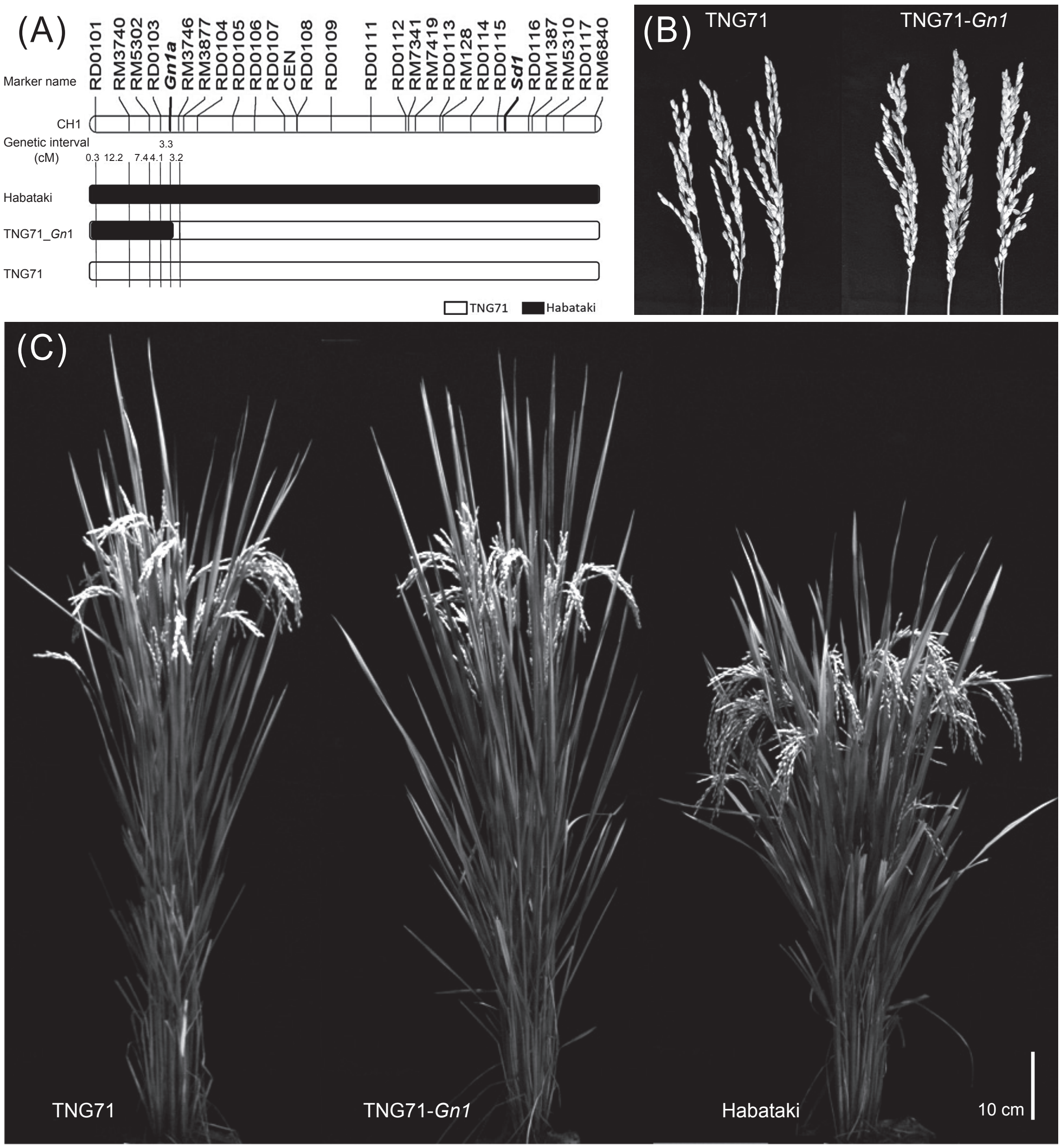


圖 4.　台農 71 號 *Gn1* 多粒數品系與其兩親本之基因型圖解以及成熟期株型紀錄。(A) 各品系基因型組成；(B) 多粒數品系台農 71 號 *Gn1* 與輪迴親「台農 71 號」稻穗表現；(C) 多粒數品系台農 71 號 *Gn1* 與兩親本之株型。

Fig. 4.　Graphical genotypes and morphological characteristics of TNG71-*Gn1* and its parents. (A) Graphical genotypes of each material for *Gn1* locus. (B) Comparison of panicle performance between novel line (TNG71-*Gn1*) and recurrent parent ('TNG71'). (C) Comparison of plant types between novel line (TNG71-*Gn1*) and recurrent parent ('TNG71').

較之下，2 次枝梗平均粒數維持在 3.28 粒，然主穗平均粒數減少粒數達 20.8 粒，係因每穗 2 次枝梗數由 45.3 下降為 41.7 枝；而品系 TARI71_1_3 與品系 TARI71_1_4 比較下，主穗平均粒數由 186.9 粒減少為 138.1 粒，分別在 2 次枝梗數上由 136.7 枝減少為 85.3 枝，以及 2 次枝梗平均粒數由 3.28 粒下降至 2.84 粒 (表 3)。

表 3. 「台農 71 號」第 1 號染色體置換系與其階層片段置換系在 2012 年第 2 期作之穗形結構變化。

Table 3. Comparisons of traits related to panicle architecture among 'TNG71' stepped aligned inbred recombinant lines. Data were collected in the second cropping season of 2012.

Breeding line	AGNMP[z]	TGNPB	TGNSB	PBN	SBN	AGNPB	AGNSB
TARI71_1	202.1 a[y]	51.3 a	150.9 a	9.6 a	45.4 a	5.37 a	3.36 a
TARI71_1_1	207.8 a	54.5 a	153.3 a	9.7 a	45.3 a	5.60 a	3.45 a
TARI71_1_2	194.2 ab	53.3 a	141.0 b	9.6 a	41.9 b	5.52 a	3.36 a
TARI71_1_3	186.9 b	50.1 a	136.7 b	9.3 a	41.7 b	5.40 a	3.28 a
TARI71_1_4	138.1 c	52.7 a	85.3 c	9.2 a	30.2 c	5.75 a	2.84 b

[z] AGNMP: average grain number of main panicle; TGNPB: total grain number of primary branch; TGNSB: total grain number of secondary branch; PBN: primary branch number; SBN: secondary branch number; AGNPB: average grain number of primary branch; and AGNSB: average grain number of secondary branch.

[y] Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

藉由各品系間置換「台農 71 號」的不等染色體片段，在第 1 號染色體短臂前 30 cM 分別採用 5 個分子標幟與 1 個 *Gn1a* 功能性標幟，將此區段區劃分成 6 個區間，並由各品系間的性狀顯著性分析可知，在每穗粒數、2 次枝梗總粒數 (total grain number of secondary branch; TGNSB)、2 次枝梗平均粒數 (average grain number of secondary branch; AGNSB) 與 2 次枝梗數 (secondary branch number; SBN) 在品系間存有顯著性差異，且隨著品系間的 'Habataki' 導入片段逐漸減少，發現 2 次枝梗總粒數與 2 次枝梗數在品系間的平均值出現過 2 次轉折差異，而 2 次枝梗平均粒數在品系間則僅出現 1 次變異。已知 *Gn1a* 基因座位於 A5–A6 區間下，且 *Gn1b* 基因座在其上游，由此可推知 *Gn1b* 基因坐落在 A2–A3 區間中。*Gn1a* 基因座會同時影響 2 次枝梗平均粒數與 2 次枝梗數，進而提升 2 次枝梗總粒數與每穗粒數，但 *Gn1b* 基因座對於 2 次枝梗總粒數的貢獻則僅來自於 2 次枝梗數的變異。另僅考量 2 次枝梗數，亦發現在各品系間的差異有類似 2 次轉折變異的趨勢，顯示 *qSBN1* 基因座符合文獻坐落於 A2–A6 區間中且可細分為 2 個子基因座 (圖 2)。

討論

持續提高稻穀產能，一直係稻作改良目標中重要的一環，隨著生物技術與相關遺傳研究日漸普及，並將落實分子輔助篩選技術至育種程序中，增加試驗資源的利用效率與運用彈性。然目標 QTL 在分子輔助育種運用上遭遇 3 種問題，其一在定位族群中所發現的有益對偶基因是否能運用在育種品系上且順利表現；其二是 QTL 的信賴區間可能過大無法適用於輔助選育上，而且個別 QTL 的效應相對上比較小的話，可能會造成改良效應不彰；其三則是堆砌不同性狀的 QTL 時，因上位效應關係導致改良效果不彰 (Ashikari & Matsuoka 2006; Collard & Mackill 2008)。過去對於稻穀產量或相關構成要素等性狀已累積相當豐厚的遺傳訊息 (Bai *et al*. 2012; Huang *et al*. 2013; Ikeda *et al*. 2013)，回顧過去藉由 MAS 技術協助改良稻穀產能的成功範例，多是仰賴改良由主效基因控制的病蟲害、生育日數或是耐逆境等 (Zhou *et al*. 2003; Chen *et al*. 2004; He *et al*. 2004; Joseph *et al*. 2004; Sharma *et al*. 2004; Tan *et al*. 2005; Neeraja *et al*. 2007; Chen *et al*. 2010; Kumar *et al*. 2014; Lin *et al*. 2014)，相較之下對於直接改良產量構成要素的研究則較受限 (Ashikari *et al*. 2005; Ando *et al*. 2008; Wang *et al*. 2012; Zong *et al*. 2012)，此亦是本文所要努力之處。對於稻穀產量般的複雜數量性狀，可能受到不同遺傳背景、栽培環境或構成要素間的補償效應導致產能無法如預期提升，因此對於已知基因仍需進一步驗證其改良效應。以本篇成果作為初期基礎，冀望逐漸堆疊多個累加效應的 QTL，以達到顯著的改良效果 (Guo & Ye 2014; Wang *et al*. 2014)。

Yan *et al*. (2009) 研究中亦針對每穗粒數 *Gn1a*、粒長 *GS3* 與粒寬 *GW2* 基因座設計功能性標幟，其中分析 156 個秈、粳稻種原，發現 121 份粳稻中僅 21.5% 帶有 *Gn1a* 對偶基因，兩亞種間偏低的滲入比率顯示此類有助提高產量構成要素的基因尚未被廣泛運用。Sun *et al*. (2012) 分析 1963–2008 年間東北地區 78 個主要粳稻品種，也顯示僅只有 2 個粳稻品種攜有 *Gn1a* 對偶基因。推測過去育種程序中儘管選用具有該優良基因的秈稻親本，但粒數屬於數量性狀僅仰賴形態選拔，導致該基因不易保留在雜交後裔中。有鑒於此，本研究已成功將秈稻產量基因藉由分子輔助選拔逐漸滲入國內粳稻栽培背景中，有助加速國內選育聚合亞種間的優良基因型組合。

在日本栽培環境中顯示，「越光」(‘Koshihikari’) 背景下的 *Gn1* 近同源系在每穗粒數可提升 45%，而每株總粒數則可以提升 34% (Ashikari *et al*. 2005)。然 Yan *et al*. (2009) 研究中，曾在 2007 年中國大陸江蘇省揚州大學試驗農場種植 ‘Sasanishiki’/‘Habataki’ 染色體置換系族群，其中 ‘Habataki’ 的每穗粒數約 200 粒，此與 Ashikari *et al*. (2005) 研究中報導 ‘Habataki’ 在日本種植時每穗粒數可達 306 粒，相較之下短少了 35%。但是，從染色體置換系族群 ‘Sasanishiki’/‘Habataki’ 中仍可發現 *Gn1* 在粳稻背景中具有明顯效應，可知 *Gn1* 的功能有助表現每穗粒數的性狀，儘管該性狀容易受到環境因子的影響，對於利用 Ha-*Gn1a* 對偶基因有助提升每穗粒數的表現。本試驗所選育台農 71 號 *Gn1* 品系亦有相同效應，每穗粒數較「台農 71 號」提升了 26%，由 105.2 (± 37.4) 增加為 133.1 (± 61.9) 粒。雖不及前人研究中近同源系 Koshihikari-*Gn1* 較 ‘Koshihikari’ 的每穗粒數由 164 粒提升至 237 粒，增加幅度達 44.5%，仍顯示在亞熱帶地區對於提高台灣粳稻粒數仍具選拔增進。惟整體產量因穗頸稻熱病與稔實率不佳而無法彰顯，未來將利用肥料試驗調整肥培管理，或堆疊充實率與高光合效能相關基因以平衡植株內供源關係進行改善。

粒數基因座 *Gn1* 在前人研究上原利用 96 個 BIL (backcross inbred line) 分離後裔進行定位分析，將粒數基因座 *Gn1* 定位到離最近分子標幟 BB-85 達 22.6 cM 的位置上，進一步再以 96 株近同源系 NIL-*Gn1* 的 F_2 後裔進行精細定位，將 *Gn1* 基因座細分為 *Gn1a* 與 *Gn1b* 基因座。其中，*Gn1a* 位於分子標幟 R3192 與 C12072S 之間 2 cM 的區間內，但只顯示 *Gn1b* 基因座位於 *Gn1a* 的上游而未表示詳細區間資訊，‘Habataki’ 在 *Gn1a* 與 *Gn1b* 基因座的貢獻效應相同，加上 *Gn1a* 基因座已明確限縮於兩個分子標幟間，因此選擇 *Gn1a* 基因座進行擄圖選殖分析。最終利用 13,000 株近同源系 NIL-*Gn1a* 的 F_2 後裔，將 *Gn1a* 基因座的區間縮減至 6.3 Kb 內，且 NIL-*Gn1a* 多粒數近同源系能比 ‘Koshihikari’ 提升 21% 的每穗粒數，但 *Gn1b* 基因座則仍未完成精細定位分析 (Ashikari *et al*. 2005)。

階層式置換系具有可連續排列置換不同大小片段的特徵，能快速縮短定位區間並重複試驗 (Koumproglou *et al*. 2002)，希望能進一步釐清 *Gn1a*、*Gn1b* 與 *qSBN1* 基因座的位置與性狀功能；兩兩比較相鄰置換品系的性狀差異可知 (圖 2、表 3)，每穗粒數增加係因 2 次枝梗總粒數增加，但 1 次枝梗總粒數不具貢獻。進一步觀察 2 次枝梗相關性狀，顯示 Ha-*Gn1a* 同時影響 2 次枝梗數與 2 次枝梗平均粒數，而 A2–A3 區間中可以發現品系間的大多穗形結構要素均維持不變，僅 2 次枝梗數下降為 41.7 枝進而使得每穗粒數下降為 186.9 粒，該區間與前人研究中 *Gn1b* 基因座位置相近。文獻中曾提及，*Gn1a* 與 *Gn1b* 基因座的效應相近 (Ashikari *et al*. 2005)，但本試驗則在每穗粒數上發現 Gn1a 的效應是 *Gn1b* 基因座的 3 倍。若以品系 TARI71_1 與 TARI71_1_1 的每穗粒數平均為 204.9 粒視為 Ha-*Gn1a* + Ha-*Gn1b* 的品系表現 (式 1)，品系 TARI71_1_2 與 TARI71_1_3 的每穗粒數平均為 190.5 粒則為帶有 Ha-*Gn1a* 的品系表現 (式 2)，品系 TARI71_1_4 則不帶有 Ha-*Gn1a* 或 Ha-*Gn1b* 多粒數對偶基因表現為 138.1 粒 (式 3)。推估 Ha-Gn1a 的估算效應為 52.4 粒 (式 2– 式 3)，而 Ha-Gn1b 的估算效為 14.4 粒 (式 1– 式 2)，

係 Ha-Gn1a 效應的 3 分之 1，主要影響 2 次枝梗粒數與其平均粒數，使整體穗型結構趨於更加密集。其次，2 次枝梗數基因座上，在整體 A2–A6 區間中可見 1 次枝梗數在品係間表現相近，然 2 次枝梗數則連續 2 次調降的趨勢，亦與 *qSBN1* 基因座效應相符合，對於 2 次枝梗數與 2 次枝梗數上的平均粒數均有貢獻。換言之，*qSBN1* 基因座可細分為 2 個子基因座，分別會增加 2 次枝梗數 38.4% (A5–A6 區間) 與 11.7% (A2–A3 區間)。

在有限資源下，希望能強化將分子輔助技術落實育種程序中，並有效精簡試驗規模、分散各階段作業人力密集性。將品系基因型篩選依序進行前景選拔、重組體選拔與背景選拔，能有效挑選出目標植株並精簡分析規模，以本試驗篩檢 TNG71-*Gn1* 的 BC_1 回交後裔為例，對整體試驗族群進行完整分析需耗費 15,484 個反應 (158 markers × 98 plants)，而本次採階梯式篩選分析 4,338 反應，約可精簡 40–70% 的試驗規模 (Frisch *et al*. 1999a, b)，能有效分散各階段的作業期程。實務上可利用播種到移植前的育苗時期在溫室進行前景選拔，作業時間約略僅有 2 wk，以單基因為例，僅需利用 1 個功能性分子標幟或 2 個連鎖標幟先行淘汰大量非目標品系，得以配合移植期程能在正常栽培季節下妥善獲得正常性狀表現，並有效精簡田間觀察品系數目，讓田間試驗資源與實驗室篩選規模能更具調整彈性。而植株成活後至抽穗前約有 1–1.5 mo，在田間定植後才針對目標品系進行重組體篩選、背景篩選或形態評估。在而背景篩選中，若全基因組標幟的密度區間為 12.5 cM 為例，BC_1 世代針對背景全基因組篩選時，可考量先以寬鬆間距 20 至 30 cM 作為初步篩選，能快速挑選出具有高背景回復率之候選親本。在高世代回交後裔上，則分析尚未回復成輪迴親的組成，並逐步增加背景標幟密度。另在 BC_1F_1 與 BC_2F_1 世代，可能因為抽穗期過早等連鎖累贅效應，先篩選目標基因座兩側發生重組者外，亦可優先挑選抽穗期接近的品系，將有助後續世代雜交數目增加。至 BC_3 世代，則可大量培育回交後裔用以提高背景回復率，乃至 BC_3F_2 世代固定目標基因時仍可提高背景回復率。對於背景選拔的實務建議，則針對沒有攜帶目標基因的每條染色體僅擺放 4 個獨立分子標幟，平均擺放分子標幟將有助減少所需的族群數，在高世代進行背景篩選會更具選拔效率，每個世代透過多階段篩選能更有效減少分析規模 (Frisch *et al*. 1999a)。

本試驗成功將秈稻多粒數基因 Ha-*Gn1* 導入台灣粳稻栽培品種中，有助日後提高亞種間優良基因滲入效率，改良後能較「台農 71 號」有效提高每穗粒數 26 至 133.1 (± 61.9) 粒。同時也進一步確認粒數基因座 *Gn1a*、*Gn1b* 與 2 次枝梗數基因座 *qSBN1* 對穎花數與穗形結構的關係，結果顯示 *Gn1a* 基因座係提升 2 次枝梗總粒數且增加 2 次枝梗平均粒數。在上游區間 *Gn1b* 基因座，則影響 2 次枝梗數使得每穗粒數增加，但貢獻效應僅為 3 分之 1。又因 *Gn1* 基因座與 *qSBN1* 基因座相互重疊，可知 *qSBN1* 基因座應細分為 2 個子基因座，且其效應影響不一。考量產量性狀易受環境干擾，未來將持續累積多期作產量試驗資料以增加評估穩健性，以資進行綜合變方分析與兩兩比較品系確認目標基因座效應。

誌謝

感謝行政院農業委員會農業試驗所技術人員莊垣漳、研究助理莊雯凌、林孟誼、平嘉雲、吳佩真、張輔升君在試驗期間陸續提供協助核酸分析與性狀取樣調查。本研究承行政院農業委員會經費 99 年至 102 年補助 [99-101 農科-4.2.1-農-C1(5)、102 農科-9.2.1-農-C2]，謹此致謝。

引用文獻

Ando, T., T. Yamamoto, T. Shimizu, X. F. Ma, A. Shomura, Y. Takeuchi, S. Y. Lin, and M. Yano. 2008. Genetic dissection and pyramiding of quantitative traits for panicle architecture by using chromosomal segment substitution lines in rice. Theor. Appl. Genet. 116:881–890.

Ashikari, M. and M. Matsuoka. 2006. Identification, isolation and pyramiding of quantitative trait loci for rice breeding. Trends Plant Sci. 11:344–350.

Ashikari, M., H. Sakakibara, S. Lin, T. Yamamoto, T. Takashi, A. Nishimura, E. R. Angeles, Q. Qian, H. Kitano, and M. Matsuoka. 2005. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. Science 309:741–745.

Bai, X., B. Wu, and Y. Xing. 2012. Yield-related QTLs and their applications in rice genetic improvement. J. Integr. Plant Biol. 54:300–311.

Chen, C. S., R. K. Chen, H. H. Chin, and Y. R. Lin. 2010. Introgression of three heading date genes, *hd1*, *Hd6*, and *ehd1*, to *Oryza sativa* L. japonica cv. Koshihikari by marker-assisted selection. Crop Environ. Bioinform. 7:1–20. (in Chinese with English abstract)

Chen, X. W., S. G. Li, Y. Q. Ma, H. Y. Li, K. D. Zhou, and L. H. Zhu. 2004. Marker-assisted selection and pyramiding for three blast resistance genes, *Pi-d(t)1*, *Pi-b*, *Pi-ta2*, in rice. Chin. J. Biotechnol. 20:708–714. (in Chinese with English abstract)

Collard, B. C. Y. and D. J. Mackill. 2008. Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century. Philos. T. Roy. Soc. B 363:557–572.

Frisch, M., M. Bohn, and A. E. Melchinger. 1999a. Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene. Crop Sci. 39:1295–1301.

Frisch, M., M. Bohn, and A. E. Melchinger. 1999b. Minimum sample size and optimal positioning of flanking markers in marker-assisted backcrossing for transfer of a target gene. Crop Sci. 39:967–975.

Guo, L. B. and G. Y. Ye. 2014. Use of major quantitative trait loci to improve grain yield of rice. Rice Sci. 21:65–82.

Harushima, Y., M. Yano, P. Shomura, M. Sato, T. Shimano, Y. Kuboki, T. Yamamoto, S. Y. Lin, B. A. Antonio, A. Parco, H. Kajiya, N. Huang, K. Yamamoto, Y. Nagamura, N. Kurata, G. S. Khush, and T. Sasaki. 1998. A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F_2 population. Genetics 148:479–494.

Hashida, Y., N. Aoki, H. Kawanishi, M. Okamura, T. Ebitani, T. Hirose, T. Yamagishi, and R. Ohsugi. 2013. A near isogenic line of rice carrying chromosome segments containing *OsSPS1* of Kasalath in the genetic background of Koshihikari produces an increased spikelet number per panicle. Field Crop Res. 149:56–62.

He, G. M., C. Q. Sun, Y. C. Fu, Q. Fu, K. J. Zhao, C. L. Wang, Q. Zhang, Z. Z. Ling, and X. K. Wang. 2004. Pyramiding of senescence-inhibition *IPT* gene and *Xa23* for resistance to bacterial blight in rice (*Oryza sativa* L.). Acta Genet. Sin. 31:836–841. (in Chinese with English abstract)

Huang, R., L. Jiang, J. Zheng, T. Wang, H. Wang, Y. Huang, and Z. Hong. 2013. Genetic bases of rice grain shape: So many genes, so little known. Trends Plant Sci. 18:218–226.

Huang, X., Q. Qian, Z. Liu, H. Sun, S. He, D. Luo, G. Xia, C. Chu, J. Li, and X. Fu. 2009. Natural variation at the *DEP1* locus enhances grain yield in rice. Nat. Genet. 41:494–497.

Ikeda, K., M. Ito, N. Nagasawa, J. Kyozuka, and Y. Nagato. 2007. Rice *ABERRANT PANICLE ORGANIZATION 1*, encoding an F-box protein, regulates meristem fate. Plant J. 51:1030–1040.

Ikeda, M., K. Miura, K. Aya, H. Kitano, and M. Matsuoka. 2013. Genes offering the potential for designing yield-related traits in rice. Curr. Opin. Plant Biol. 16:213–220.

International Rice Genome Sequencing Project. 2005. The map-based sequence of the rice genome. Nature 436:793–800.

Joseph, M., S. Gopalakrishnan, R. K. Sharma, V. P. Singh, A. K. Singh, N. K. Singh, and T. Mohapatra. 2004. Combining bacterial blight resistance and basmati quality characteristics by phenotypic and molecular marker-assisted selection in rice. Mol. Breeding 13:377–387.

Kobayashi, A., Y. Koga, H. Uchiyamada, H. Horiuchi, K. Miura, K. Okuno, K. Fujita, Y. Uehara, S. Ishizaka, M. Nakagahra, and T. Yamada. 1990. Breeding a new rice variety ‘Habataki’. Bull. Hokuriku Natl. Agric. Exp. Stn. 32:65–84. (in Japanese)

Koumproglou, R., T. M. Wilkes, P. Townson, X. Y. Wang, J. Beynon, H. S. Pooni, H. J. Newbury, and M. J. Kearsey. 2002. STAIRS: A new genetic resource for functional genomic studies of *Arabidopsis*. Plant J. 31:355–364.

Kumar, A., S. Dixit, T. Ram, R. B. Yadaw, K. K. Mishra, and N. P. Mandal. 2014. Breeding high-yielding drought-tolerant rice: Genetic variations and conventional and molecular approaches. J. Exp. Bot. 65:6265–6278.

Lin, K. H., C. W. Kuo, Y. C. Hsu, Y. R. Lin, and Y. P. Wu. 2014. Increasing drought tolerance of rice cultivar ‘TK9’ using marker-assisted selection. Crop Environ. Bioinform. 11:177–194. (in Chinese with English abstract)

Lin, T. F. 1990. Effect of yield components on the yield of rice in central Taiwan. Bull. Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Sta. 26:17–23. (in Chinese with English abstract)

Miura, K., M. Ikeda, A. Matsubara, X. J. Song, M. Ito, K. Asano, M. Matsuoka, H. Kitano, and M. Ashikari. 2010. *OsSPL14* promotes panicle branching and

higher grain productivity in rice. Nat. Genet. 42:545–549.

Neeraja, C. N., R. Maghirang-Rodriguez, A. Pamplona, S. Heuer, B. C. Y. Collard, E. M. Septiningsih, G. Vergara, D. Sanchez, K. Xu, A. M. Ismail, and D. J. Mackill. 2007. A marker-assisted backcross approach for developing submergence-tolerant rice cultivars. Theor. Appl. Genet. 115:767–776.

Ohsumi, A., T. Takai, M. Ida, T. Yamamoto, Y. Arai-Sanoh, M. Yano, T. Ando, and M. Kondo. 2011. Evaluation of yield performance in rice near-isogenic lines with increased spikelet number. Field Crops Res. 120:68–75.

Peng, S., G. S. Khush, P. Virk, Q. Tang, and Y. Zou. 2008. Progress in ideotype breeding to increase rice yield potential. Field Crop Res. 108:32–38.

Sharma, P. N., A. Torii, S. Takumi, N. Mori, and C. Nakamura. 2004. Marker-assisted pyramiding of brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance genes *Bph1* and *Bph2* on rice chromosome 12. Hereditas 140:61–69.

Shomura, A., T. Izawa, K. Ebana, T. Ebitani, H. Kanegae, S. Konishi, and M. Yano. 2008. Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication. Nat. Genet. 40:1023–1028.

Song, X. J., W. Huang, M. Shi, M. Z. Zhu, and H. X. Lin. 2007. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. Nat. Genet. 39:623–630.

Sun, J., D. Liu, J. Y. Wang, D. R. Ma, L. Tang, H. Gao, Z. J. Xu, and W. F. Chen. 2012. The contribution of intersubspecific hybridization to the breeding of super-high-yielding japonica rice in northeast China. Theor. Appl. Genet. 125:1149–1157.

Tan, C. X., X. M. Ji, Y. Yang, X. Y. Pan, S. M. Zuo, Y. F. Zhang, J. H. Zou, Z. X. Chen, L. H. Zhu, and X. B. Pan. 2005. Identification and marker-assisted selection of two major quantitative genes controlling rice sheath blight resistance in backcross generations. Acta Genet. Sin. 32:399–405. (in Chinese with English abstract)

Terao, T., K. Nagata, K. Morino, and T. Hirose. 2010. A gene controlling the number of primary rachis branches also controls the vascular bundle formation and hence is responsible to increase the harvest index and grain yield in rice. Theor. Appl. Genet. 120:875–893.

Wang, E., J. Wang, X. Zhu, W. Hao, L. Wang, Q. Li, L. Zhang, W. He, B. Lu, H. Lin, H. Ma, G. Zhang, and Z. He. 2008. Control of rice grain-filling and yield by a gene with a potential signature of domestication. Nat. Genet. 40:1370–1374.

Wang, P., Y. Xing, Z. Li, and S. Yu. 2012. Improving rice yield and quality by QTL pyramiding. Mol. Breeding 29:903–913.

Wang, X., Y. Pang, J. Zhang, Q. Zhang, Y. Tao, B. Feng, T. Zheng, J. Xu, and Z. Li. 2014. Genetic background effects on QTL and QTL × environment interaction for yield and its component traits as revealed by reciprocal introgression lines in rice. The Crop J. 2:345–357.

Wu, D. H., H. P. Wu, C. S. Wang, H. Y. Tseng, and K. K. Hwu. 2013. Genome-wide InDel marker system for application in rice breeding and mapping studies. Euphytica 192:131–143.

Yan, C. J., S. Yan, Y. C. Yang, X. H. Zeng, Y. W. Fang, S. Y. Zeng, C. Y. Tian, Y. W. Sun, S. Z. Tang, and M. H. Gu. 2009. Development of gene-tagged markers for quantitative trait loci underlying rice yield components. Euphytica 169:215–226.

Zhou, P. H., Y. F. Tan, Y. Q. He, C. G. Xu, and Q. Zhang. 2003. Simultaneous improvement for four quality traits of Zhenshan 97, an elite parent of hybrid rice, by molecular marker assisted selection. Theor. Appl. Genet. 106:326–331.

Zong, G., A. Wang, L. Wang, G. Liang, M. Gu, T. Sang, and B. Han. 2012. A pyramid breeding of eight grain-yield related quantitative trait loci based on marker-assistant and phenotype selection in rice (*Oryza sativa* L.). J. Genet. Genom. 39:335–350.

Study on Development of *Japonica* Breeding Lines Introgressed High Grain Number Gene through Marker-Assisted Backcross Approach

Ming-Hsing Lai[1], Charng-Pei Li[2], Woei-Shyuan Jwo[2], Hsing-Mu Yen[2], Kae-Kang Hwu[3], and Dong-Hong Wu[2,*]

Abstract

Lai, M. H., C. P. Li, W. S. Jwo, H. M. Yen, K. K. Hwu, and D. H. Wu. 2016. Study on development of *japonica* breeding lines introgressed high grain number gene through marker-assisted backcross approach. J. Taiwan Agric. Res. 65(1):31–44.

Rice grain number, a quantitative trait, is difficult to be selected in early generations and needs to be evaluated its genetic gain number based on replicate filed trials during breeding procedure. In order to improve the introgressed efficiency of grain yield related genes and validate QTL effect between *japonica-indica* cross, this study introduced the high grain number gene, *Gn1*, from 'Habataki' (*indica* type) into 'Tainung71' ('TNG71'), a *japonica* cultivar with high eating quality, to assess the yield potential of the near-isogenic lines through marker-assisted backcross approach. The development of near-isogenic lines used 6 flanking markers of *Gn1* locus for foreground selection and 152 SSR and InDel markers with an average of 10.8 cM for background selection. Genotyping assay showed that one BC_3F_2 plant (TNG71-*Gn1*) has completely recovered the recurrent 'TNG71' genome except a 30 cM segment harboring *Gn1* on the short arm of chromosome 1. TNG71-*Gn1* had the same heading date, panicle number, and plant height as the recurrent parent, 'TNG71', while TNG71-*Gn1* had higher grain number per panicle than 'TNG71'. In addition, four 'TNG71' stepped aligned inbred recombinant lines different from their introgressed chromosmal region harboring *Gn1* gene on chromosomal 1 were developed in order to investigate the relationship among *Gn1a*, *Gn1b*, and *qSBN1* loci for genetic effects on rachis branch and spikelet number. Genetic analysis showed that *Gn1a* locus increased secondary branch number and average grain number of secondary branch, but not average grain number of primary branch. *Gn1b* locus, which located in upstream region, would be beneficial on second branch number resulting in increased grain number. The *qSNB1* locus consisted of two sub-loci and explained 38.4% and 11.7% of the difference in the second secondary branch number between 'Habataki' and 'TNG71', respectively.

Key words: *Oryza sativa* L., Grain number, Marker assisted backcross, Grain yield.

Received: May 20, 2015; Accepted: June 30, 2015.
[*] Corresponding author, e-mail: dhwu@tari.gov.tw
[1] Associate Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Research Fellows, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Associate Professor, Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 65(1):45–53 (2016)
DOI: 10.6156/JTAR/2016.06501.05 **研究報告**

甘藷基腐病菌 *Phomopsis destruens* 生理特性及防治技術研究

黃巧雯[1] 楊宏仁[2] 林靜宜[1] 許淑麗[3] 賴素玉[3] 倪蕙芳[4,*]

摘要

黃巧雯、楊宏仁、林靜宜、許淑麗、賴素玉、倪蕙芳。2016。甘藷基腐病菌 *Phomopsis destruens* 生理特性及防治技術研究。台灣農業研究 65(1):45–53。

甘藷基腐病 (foot rot) 由 *Phomopsis destruens* 所引起，為近年來限制甘藷生產之重要病害。本研究於甘藷田區進行甘藷基腐病發生調查，得知此病源菌不僅危害鮮藷用之「台農 57 號」及「台農 66 號」，亦危害葉菜用甘藷「台農 71 號」，顯示台灣主要栽培的甘藷品種皆不具抗病性。本病原菌絲生長之最適溫度為 20℃，於 25–30℃時為分生孢子發芽適溫，而 15–30℃範圍本病害均會發生。於健康種苗、罹病種苗及病土對甘藷基腐病發生之影響試驗中，發現罹病種苗種植於健康土中具有 100% 發病率，顯示罹病種苗為本病害重要感染源之一，因此清潔種苗來源為防治本病害之重要策略。另外，本研究進行淹水處理對病害發生之影響評估，結果發現病藷淹水 1 wk 後即失去作為感染源之能力，而罹病藤蔓於淹水 2 wk 以上亦可喪失作為田間感染源之能力。因此，建議發病田區應儘量與水稻輪作，若未能種植水稻仍應執行淹水 2 wk 以上，以消滅病藷及罹病殘體上之菌體，避免成為下一期作之感染源。

關鍵詞：甘藷、甘藷基腐病、病害防治。

前言

甘藷為旋花科 (Convolvulaceae) 甘藷屬 (*Ipomoea*) 之一年生或多年生草本植物，學名為 *Ipomoea batatas* (L.) Lam.，英名為 sweet potato，一般又稱為番藷、地瓜、山芋、玉秋藷、甜藷、朱藷、赤藷、金藷等。甘藷原產於南美，在台灣至今已有 400 多年栽培歷史，各種土壤均可栽植，其中又以排水良好的砂質壤土及土壤 pH 在 5.5–8.0 之間者為佳 (http://web.tari.gov.tw/techcd/)。甘藷栽培遍及台灣各縣市，以中南部的雲林、嘉義，台南，高雄及屏東等地區栽培最多，根據行政院農委會 2013 年農業統計年報 (http://www.afa.gov.tw/Public/GrainStatistics/20145211623337055.pdf) 統計，全台灣的甘藷栽種面積約為 9,662 ha，年產量約為 215,000 Mg，其塊根主要供食用與加工使用。目前最普遍的甘藷塊根栽培食用品種為「台農 57 號」與「台農 66 號」，葉菜用品種為「台農 71 號」與「桃園 2 號」。

根據台灣植物病害名彙 (Hsu *et al*. 2002) 及相關研究報告紀錄，在甘藷主要病害有由甘藷羽狀斑駁病毒 (*sweet potato feathery mottle virus*; SPFMV)、甘藷潛伏病毒 (*sweet potato latent virus*; SPLV) 及甘藷捲葉病毒 (*sweet potato leaf curl virus*; SPLCV) 引起之病毒病 (Chung *et al*. 1981; Chung *et al*. 1985)；真菌性病害有由 *Elsinoe batata* (Saw.) Viegas et

投稿日期：2015 年 4 月 27 日；接受日期：2015 年 7 月 1 日。
* 通訊作者：hfni@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所研究員兼分所長。台灣 嘉義市。
[3] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系研究助理。台灣 嘉義市。
[4] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系副研究員兼系主任。台灣 嘉義市。

Jenkins 引起之縮芽病、由 *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas* (Woll.) Snyder & Hansen 引起之蔓割病、由 *Rhizopus stolonifera* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. 引起之軟腐病，以及近年來發現由 *Phomopsis destruens* (Harter) Boerema 引起之基腐病 (Huang *et al*. 2012)。另外，亦有由 Mycoplasma like Organism 引起之簇葉病 (Yang 1969) 及由 *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al*. 引起之細菌性青枯病 (Chen *et al*. 2012)。其中，由 *P. destruens* 引起之甘藷基腐病 (foot rot)，乃由 Huang *et al*. (2012) 於 2008 年自花蓮縣鳳林鎮及彰化縣大城鄉之甘藷藤蔓病害樣品上，經鏡檢病原形態後鑑定為過去僅在中、南美地區發生的甘藷基腐病。甘藷基腐病最早發現於 1912 年美國維吉尼亞州 (Virginia) 內沼澤地區 (Dismal Swamp region) 之甘藷田，當時將近 95% 甘藷植株被感染，損失率平均為 10–50%，有的田區甚至高達 95% 損失率因而導致廢耕，對甘藷產業影響頗大 (Harter & Weimer 1929)。之後，在密蘇里州 (Missouri)、愛荷華州 (Iowa)、俄亥俄州 (Ohio)、馬里蘭 (Maryland)、格魯吉亞 (Georgia) 及巴西 (Brazil) 等甘藷栽培地區皆陸續發現此病害發生 (Harter & Weimer 1929; Lopes *et al*. 1994)。

本病害之病徵為引起甘藷地下莖部產生黑褐色乾腐，並向上造成地上部莖基部迅速褐化乾枯，受害株生長勢衰弱。部分品種葉部初期呈現紅化現象，進而黃化枯萎，藤蔓乾枯死亡。然而，會引起甘藷地上部黃化萎凋、莖基部黑褐色壞疽病徵之病害，亦有青枯病與蔓割病等重要甘藷病害，彼此間病徵差異在於基腐病於罹病藤蔓表面上會產生黑色大小不一之圓形凸起物，是為基腐病菌柄子器 (pycnidia) (Huang *et al*. 2012)；蔓割病病徵係在藤蔓上會造成縱向裂開現象，削開罹病藤蔓可見維管束褐化 (Clark 1994)；而青枯病則在莖基部造成縊縮腐爛現象，橫切被害莖可見維管束褐變 (Chen *et al*. 2012)。除此之外，基腐病病徵表現亦可從地下部由莖基部向塊根擴散，塊根受害部位表面呈淡褐色濕腐，剖開組織褐色腐爛具濕臭味，進而導致罹病株幾乎無法收成及塊根無法儲藏 (Harter 1913b; Lopes *et al*. 1994; Clark *et al*. 2013)，乃成為甘藷產業重要限制因子。

目前國外在甘藷基腐病防治策略上，以選擇健康種苗種植、輪作方式或利用藥劑「腐絕」(thiabendazole) 處理罹病苗，皆可有效控制甘藷基腐病發生 (Martin 1972; Lopes & Silva 1993; Clark *et al*. 2013)。然而，在台灣從未針對此病害進行相關研究，因此本研究除就台灣甘藷田區進行甘藷基腐病發生調查及產量比較外，並針對甘藷基腐病菌之生理及傳播特性等進行研究，以期能擬出有效防治策略提供農友參採。

材料方法

病害調查

本研究於 2012–2013 年在台灣中南部主要甘藷栽培產區，包括台中、南投、嘉義及台南等共 20 個田區，進行基腐病發生調查。調查方式為每 1 田區調查面積約為 1 分地共 3,000 株，在甘藷採收前 1 wk 開始進行基腐病病害調查，其田區甘藷基腐病之發生率計算公式如下：發生率 (incidence, %) = (植株地基部出現基腐病徵及病兆之罹病植株數/調查全數植株之總數) × 100%。其中，以 5 個田區進行產量統計。

病原菌分離及保存

將罹病甘藷植株藤蔓以清水洗淨，再以 75% 酒精消毒 30 s，繼而以 0.5% 次氯酸鈉漂洗消毒 30 s，最後再以無菌水漂洗 2 次。自然風乾後，利用滅菌過之解剖刀切取藤蔓上病健部相連組織，置於以乳酸 (lactic acid) 酸化至 pH 值為 3.8 之 APDA 培養基上 [配製方法為：將 750 µL 50% (v/v) 乳酸溶液加入已滅菌降溫到約 55℃之 300 mL PDA (potato dextrose agar, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)] 中輕晃混勻，再倒入 9 cm 培養皿中備用，待分離之病原長出後將其單一菌絲尖端移至 PDA 培養基中純化。由於本病原生長極慢，組織分離時極易被其他生長較快的真菌覆蓋，因此為提高其病原分離之成功率，亦可將罹病甘藷

藤蔓或薯塊清洗消毒後進行保濕。待柄子器 (pycnidia) 內孢子泌出後，直接以消毒後之解剖刀沾取分生孢子，移至 APDA 培養基上於室溫下 (25–30℃) 培養約 5–7 d。菌絲長出後，切取菌絲尖端於 PDA 進行純化培養約 14 d，待產孢後，將其孢子塗布於 2% 水瓊脂 (water agar; WA) 平板上進行單孢分離。所得之分離株依據 Harter (1913a) 與 Boerema *et al*. (1996) 之形態學鑑定為 *P. destruens* 後，將分離株培養於 PDA 斜面，並置於 8–10℃冰箱中保存，供爾後試驗之用。本研究所用之菌株來源如下：SPPD-17 菌株分離自彰化縣大城鄉之罹病甘藷藤蔓，SPPD-24 菌株分離自台中太平區葉用甘藷之罹病藤蔓。

溫度對甘藷基腐病菌菌絲生長之影響

將 *P. destruens* 菌株 SPPD-17 及 SPPD-24 菌株移植於 PDA 培養基上，並置於室溫下培養 5–7 d 後，以直徑 0.5 cm 滅菌過之打孔器切取菌落邊緣菌絲塊，將菌絲圓盤置於 PDA 培養基中央，分別置於 10、15、20、25、30、35 及 40℃之定溫箱中黑暗培養。培養後第 14 d，測量其菌絲生長之直徑，每個處理 4 重複，本試驗重複進行 2 次。

溫度對甘藷基腐病菌孢子發芽之影響

將供試菌株 SPPD-17 及 SPPD-24 菌株，培養於放置已高溫高壓滅菌之約 5 cm 甘藷莖段「台農 71 號」之水瓊脂培養基 (WA) 上，3 wk 後待其產孢，以無菌水將其所產生之分生孢子淋洗下，並製成孢子濃度約為 200 conidia 30 μL^{-1} 之懸浮液。取 50 μL 置於 3 凹載玻片孔洞內，並將玻片保濕於塑膠培養皿中，分別置於 10、15、20、25、30、35 及 40℃之定溫箱中。在黑暗下靜置 24 h 後取出，於顯微鏡下逢機計算 100 個孢子之發芽率，每個處理 6 重複，本試驗重複進行 2 次。

溫度對病害發生之影響

供試植物為來自行政院農業委員會農業試驗所嘉義農業試驗分所組培苗繁殖之「台農 71 號」甘藷健康苗。將「台農 71 號」甘藷苗扦插於裝有滅菌過泥炭土之玻璃管，分別置於 15、20、25、30 及 35℃定溫箱，並澆灌接種 20 mL SPPD-17 菌株之孢子懸浮液 (1×10^4 conidia mL^{-1}) 於每株甘藷苗地際部，每個處理 10 株，每天正常澆水管理。接種 2 wk 後，開始調查發病率，每週調查 1 次至接種 12 wk 為止，本試驗重複 2 次。

健康種苗、罹病種苗、田間罹病殘體及病土對甘藷基腐病發生之影響

本試驗之「台農 57 號」甘藷健康種苗為來自嘉義農業試驗分所由組培苗繁殖之健康種苗。罹病種苗為分別採集自台中市外埔區與台南市新化區發病田。健康土為泥炭土 (Jiffy, Tref, The Netherlands)。甘藷基腐病罹病殘體為採自發病田之罹病甘藷藤蔓，病殘體選取罹病甘藷藤蔓之地際部位往上剪取約 5 cm 長度。病土 (infested soil) 為採自甘藷基腐病罹病田區之土壤，經去除植物殘體而得。

本試驗分為以下 4 個處理組：(1) 健康苗扦插於健康土中；(2) 健康苗扦插於罹病田區病土；(3) 健康苗扦插於含罹病甘藷藤蔓 (每槽均勻混拌 20 g 病殘體) 之健康土中；(4)「台農 57 號」罹病苗扦插於健康土中。所有處理均種植於 13 cm × 17 cm × 58 cm 之長型土槽中，每個土槽除罹病種苗處理外，均扦插 10 棵「台農 57 號」甘藷健康苗，每處理 3 重覆。每天正常澆水管理，每週觀察並記錄發病情形，直到 12 wk 為止，本試驗重複 2 次。

淹水處理對病害發生之影響

由於田間病藷及罹病藤蔓可能為甘藷基腐病之重要感染源，將取自甘藷田之基腐病病薯，分別裝於塑膠籃中，每籃 10 顆病薯，置於田區並進行淹水。淹水 1 wk 及 2 wk 後，將甘藷取出做為接種源，埋於裝有泥炭土之花槽中。另將未經淹水處理之甘藷病藷做為對照組接種源，並扦插「台農 71 號」甘藷健康苗 10 株。扦插 2 wk 後，開始調查基腐病發病率至 12 wk 止。另外，取罹患基腐病之病藤蔓，分別裝於塑膠籃內，每籃放置 10 枝病藤蔓，同樣置於淹水之田區。將淹水 1 wk 及 2 wk 之甘藷罹病藤蔓取出做為感染源，埋於裝有泥炭土之花槽中，另將未經淹水之病藤蔓做為對照組

之接種源，並在旁扦插「台農 71 號」甘藷健康苗 10 株。2 wk 後，開始調查基腐病發病率至接種後 12 wk 止，本試驗共 3 重複。

統計分析

各項處理之試驗資料，利用 SAS 9.1 版統計分析軟體先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，再以最小顯著性差異 (least significant difference; LSD) 測驗在 5% 顯著水準下，比較處理間平均值之差異。

結果

甘藷基腐病之發生

自 2012 年 1 月分起開始調查中南部主要甘藷產區，包括台中市大雅、沙鹿、南投縣集集、竹山、彰化縣大城、雲林縣水林、台南市新化等地區之基腐病發病情形，結果如表 1 所示。所有調查田區皆有此病害發生，其中發病率以台中市太平之葉用甘藷「台農 71 號」品種最高，其罹病率為 80.0%，其次為台中市大雅之地方品系-品 388 及台中清水-1 之「台農 57 號」品種，其罹病率皆在 70% 以上。而在所有調查之甘藷品種上，「台農 57 號」品種之基腐病罹病率為 3.0–72.5%，而「台農 66 號」品種為 8.3–31.1%。另外，由 5 個調查田區之產量結果顯示，台中市外埔-1 田區之產量約為每分地 900 kg、台中市清水-1 田區之產量約為每分地 300–360 kg、台中市清水-2 田區之產量約為每分地 600 kg、台中市清水-3 田區之產量約為每分地 480–540 kg 及台中市大雅田區之產量約為每分地 300–360 kg。

溫度對甘藷基腐病菌絲生長及孢子發芽之影響

甘藷基腐病菌 SPPD-17 菌株及 SPPD-24

表 1. 2012–2013 年甘藷基腐病之發生率及產量分析。

Table 1. Survey of the incidence of foot rot disease and yield of sweet potato in Taiwan in 2012 and 2013.

Year	Location	Variety	Incidence (%)	Yield (kg 0.1 ha^{-1})
2012	Xinhua, Tainan-1	TN57	5.0	-^{z}
2012	Xinhua, Tainan-2	TN57	3.0	-
2012	Dacheg, Changhua-1	Pin No. 389	3.0	-
2012	Dacheg, Changhua-2	Pin No. 389	3.0	-
2012	Zhushan, Nantou-1	TN64	3.9	-
2012	Zhushan, Nantou-2	TN64	7.9	-
2012	Zhushan, Nantou-3	TN64	20.6	-
2012	Zhushan, Nantou-4	TN64	22.6	-
2012	Chiayi-1	TN57	3.0	-
2012	Chiayi-2	TN66	8.3	-
2012	Taiping, Taichung	TN71	80.0	-
2013	Waipu, Taichung-1	TN66	16.8	900
2013	Waipu, Taichung-2	TN66	31.1	-
2013	Qingshui, Taichung-1	TN57	72.5	300–360
2013	Qingshui, Taichung-2	TN57	11.7	600
2013	Qingshui, Taichung-3	Pin No. 389	38.5	480–540
2013	Zhongqing, Taichung	Pin No. 388	77.0	300–360
2013	Shueilin, Yunlin	TN57	25.5	-
2013	Zhushan, Nantou	TN64	40.0	-
2013	Xinhua, Tainan	TN57	1.0	-

^{z} No detection.

培養於不同溫度之培養箱中 14 d，其菌絲生長直徑如圖 1 所示。兩菌株均於 20℃培養時，病原菌之生長最快速，SPPD-17 及 SPPD-24 之菌絲生長平均直徑分別為 7.0 cm 及 6.2 cm；兩菌株於 10℃培養 14 d 時，SPPD-17 菌株之菌絲生長直徑僅有 1.1 cm，而 SPPD-24 菌株則完全不生長；當培養於 35℃時，兩菌株之菌絲生長直徑僅有 0.9 cm；當培養於 40℃以上時，兩菌株則完全不生長。另外，溫度對本菌分生孢子發芽之影響結果，如表 2 所示。SPPD-17 菌株而言，其於 25–30℃時，發芽率可達 90% 以上，為最適孢子發芽之溫度。SPPD-24 菌株，則以 25–35℃為最適發芽溫度，兩菌株在 10℃及 40℃時，孢子完全不發芽。

溫度對甘藷基腐病發生之影響

以 SPPD-17 菌株之分生孢子懸浮液接種於「台農 71 號」甘藷扦插苗後，分別放置於不同溫度之定溫箱中 12 wk 後調查病害的發生，結果如表 3 所示，在 15、20、25 及 30℃下其甘藷基腐病發生率分別為 88.9、80.6、100.0 及 88.9%，而 35℃下扦插苗則於接種後 12 wk，仍未見到有發病植株出現。

表 2. 溫度對 *Phomopsis destruens* SPPD-17 及 SPPD-24 分離株分生孢子發芽之影響。

Table 2. Effect of temperature on conidia germination of *Phomopsis destruens* SPPD-17 and SPPD-24 isolates for 24 h.

	Percentage of spore germination (%)	
Temperature (℃)	SPPD-17	SPPD-24
10	0.0 e[z]	0.0 d
15	40.2 d	43.3 c
20	86.5 b	75.2 b
25	95.3 a	92.2 a
30	93.3 a	90.7 a
35	67.3 c	88.8 a
40	0.0 e	0.0 d
LSD	5.6	3.8

[z] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by LSD test.

健康種苗、罹病種苗、田間病殘體及病土對甘藷基腐病發生之影響

健康種苗、罹病種苗、田間罹病殘體及病土對甘藷基腐病發生影響之試驗結果，如表 4 所示。罹病種苗種植於健康土中有 100.0% 發病率，然若將健康種苗種植於病土中，兩次試驗之甘藷基腐病發生率分別為 16.7% 及

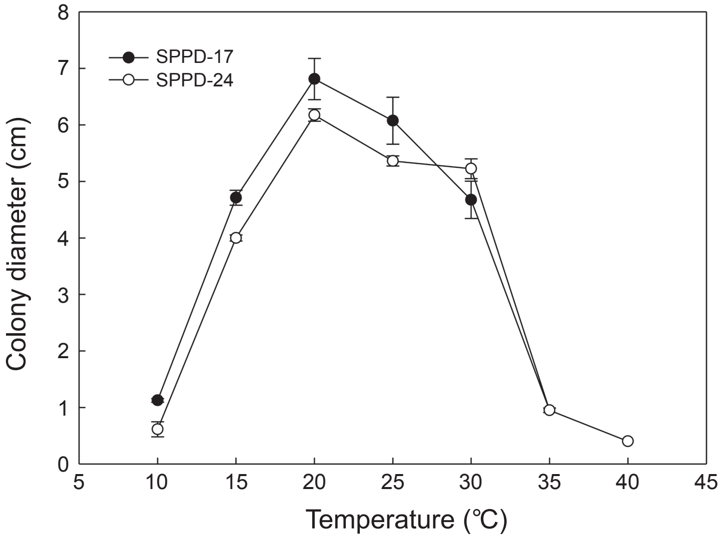


圖 1. 溫度對 *Phomopsis destruens* SPPD-17 及 SPPD-24 分離株病原菌菌絲生長之影響。

Fig. 1. Effect of temperature on the mycelial growth of *Phomopsis destruens* SPPD-17 and SPPD-24 isolates cultured on potato dextrose agar plates for 14 days.

表 3. 溫度對甘藷基腐病病害發生之影響。

Table 3. Effect of temperature on incidence of foot rot disease of sweet potato inoculated with *Phomopsis destruens* SPPD-17 isolate for 12 weeks.

Temperature (℃)	Disease incidence (%)[z]
15	88.9 a[y]
20	80.6 a
25	100.0 a
30	88.9 a
35	0.0 b
LSD	26.2

[z] Disease incidence (%) = (Number of plants which showed symptom of foot rot/10) × 100%.
[y] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by LSD test.

10.0%；若將健康種苗種植於含有罹病藤蔓殘體的泥炭土中，則兩次試驗之基腐病發生率分別為 76.7% 與 66.7%。當對照組為健康種苗種植於健康土中，兩次試驗之甘藷基腐病發生率皆為 0。

淹水處理對甘藷基腐病發生之影響

罹病甘藷藷塊及藤蔓經淹水處理 1 wk 及 2 wk 後，再評估其作為田間感染源之可能性，結果如表 5 所示。罹病藷塊經 1 wk 淹水處理後，再置於種植健康甘藷扦插苗之旁作為感染源，其基腐病發病率為 0，而以對照未經淹水之罹病藷塊作為感染源，則有 30.0% 發病率。另外，罹病藤蔓經 1 wk 淹水處理後，再放置於甘藷扦插苗旁作為感染源，其發病率為 13.3%。而經 2 wk 淹水處理後再作為感染源，

表 5. 淹水處理時間對甘藷基腐病發生之影響。

Table 5. Flooding treatment on the foot rot disease incidence of sweet potato caused by *Phomopsis destruens*.

	Disease incidence (%)[z]	
Flooding time	Diseased tuber	Diseased stem
1 wk	0.0	13.3
2 wk	0.0	0.0
CK	30.0	26.7

[z] Disease incidence (%) = (Number of plants which showed symptom of foot rot/10) × 100%.

其甘藷基腐病之發病率降至為 0，對照未經淹水處理之藤蔓作為感染源之發率病為 26.7%。

討論

由於近年來甘藷健康種苗制度之推動，使得以往造成甘藷產量大幅降低之甘藷病毒病害，如羽狀斑駁病毒 (SPFMV)、甘藷潛伏病毒 (SPLV) 及甘藷捲葉病毒 (SPLCV) 之發生率已經減少。然近年來由 *P. destruens* 引起之甘藷基腐病真菌性病害，嚴重影響植株地下部之甘藷塊根生長處，導致罹病植株幾乎完全無法產生塊根，嚴重影響產量 (Huang *et al*. 2012; Shen *et al*. 2013)。Lopes *et al*. (1994) 亦指出，甘藷基腐病於 1990 年在巴西 (Brazil) 南部地區發生造成將近 80% 甘藷產量嚴重減損。本研究於 2012–2013 年調查台灣甘藷產區基腐病之發生率顯示，各地甘藷產區均有不同程度之發生率，有些田區甚至高達 70% 以上之發生率。根據行政院農業委員會 2013 年農業統

表 4. 罹病種苗、健康種苗、田間罹病藤蔓及病土對甘藷基腐病發生之影響。

Table 4. Effect of diseased seedling, healthy seedling, diseased stem and infested soil on the incidence of foot rot disease caused by *Phomopsis destruens*.

	Disease incidence (%)[z]	
Treatment	Exp. 1	Exp. 2
Healthy seedling + Healthy soil	0.0 d[y]	0.0 c
Healthy seedling + Infested soil	16.7 c	10.0 c
Healthy seedling + Diseased stem in healthy soil	76.7 b	66.7 b
Diseased seedling + Healthy soil	100.0 a	100.0 a

[z] Disease incidence (%) = (Number of plants which showed symptom of foot rot/10) × 100%.
[y] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by LSD test.

計年報顯示，甘藷每分地平均產量約為 2,200 kg。由本研究調查結果得知，當甘藷基腐病發生率高達 72.5% 時，其甘藷產量驟降至每分地 300–360 kg。顯示甘藷在栽培期間若有基腐病發生，確實會造成產量嚴重損失。然而，在調查中同時發現，本病害不僅是在鮮藷用甘藷上如「台農 57 號」及「台農 66 號」造成減產，同時亦危害葉用甘藷「台農 71 號」，顯示台灣的主要栽培甘藷品種並未具有抗病性。根據 Clark *et al*. (2013) 報告指出，甘藷在儲藏時，基腐病菌之分生孢子可殘存於藷塊表面，當藷塊進行儲藏時，基腐病菌孢子發芽後侵入感染有傷口之健康藷塊，造成藷塊出現褐化軟腐現象。因此，由罹病田區收穫之甘藷宜儘早販售，不宜再進行儲藏，影響後續的品質。

本研究另測試溫度對 *P. destruens* 菌株菌絲生長及孢子發芽之影響，結果發現 15–30℃為本菌菌絲可生長之溫度，其中又以在 20℃培養下生長較為快速，35℃以上之溫度菌絲幾乎停止生長。另外，本研究亦發現，在 25–30℃溫度處理下，所測試的兩菌株之分生孢子之發芽率均可高達至 90% 以上，而在 20℃及 35℃處理下，分生孢子亦分別有 75% 以上及 65% 以上之發芽率。因此，台灣的溫暖氣候將有利於本病原菌侵入及感染。其次，在溫度對本病害發生之影響結果，發現在 15–30℃下皆有利於本病害進展。由此顯示，在台灣不論春作或秋作甘藷，本病害均會發生。但當溫度在 35℃時，雖然基腐病菌分生孢子有 60% 以上發芽率，但由於基腐病菌菌絲停止生長關係，35℃處理時其基腐病發生率為 0。顯見溫度在 35℃以上時，可有效降低基腐病菌存活力。以台灣的氣候條件而言，利用太陽能作為增溫來源，可作為防治該病害策略之一。Huang (1993) 曾於中部地區由 3 月開始直到 10 月為止，進行地面覆蓋處理，顯示可以提高土壤溫度達 48.5℃，應足以殺死土壤及殘體中之甘藷基腐病菌。此方法未來可進一步測試於無水源之田區，如台中市沙鹿、大雅等罹病田進行防治評估，以瞭解應用太陽能處理對甘藷基腐病防治之可行性。

本研究為瞭解本病害之主要感染源，由試驗結果顯示，罹病種苗直接種植於健康土中，甘藷基腐病之發病率為 100%。由此顯示種苗之重要性，種苗亦為本病害長距離傳播之主要媒介。因此，本病害之防堵首在種苗來源，此結果亦與 Lopes & Silva (1993) 報導指出，種苗來源若來自於罹病田區，其栽種時基腐病發生率高達為 77.7% 之研究結果相類似。此外，甘藷基腐病罹病殘體之存在，亦使健康種苗有約 70.0% 的基腐病發生率。足見在田間若有殘留的病藷及罹病藤蔓時，即使種植健康種苗則仍無法控制本病害之發生。因此，防治此病害應由推廣健康種苗及完全清園著手。惟目前健康種苗之供應量因剪苗工人力缺乏及繁殖成本的關係，仍屬供不應求，大多農友仍購自未經病害檢測認證的甘藷種苗或自行留種之種苗，品質不一。繁殖種苗之過程中若有罹病植株存在，田間發生基腐病風險相對較高。據此建議農友應選擇認證之健康種苗進行栽植，並且留意自行留種時勿種植於上期作之發病田中。在田間罹病株之清園管理上，以目前無適當農業機械輔助之栽培模式下，欲於採收後進行全區罹病植株之地上部與地下部清除，確實有相當大的困難度。因此，建議本病害之防治仍應從平時之田間管理著手，將出現病徵之罹病株地上部及地下部均一併去除帶離田間，逐年降低田間感染源密度。

在台灣，甘藷與水稻輪作係灌溉田區可用之栽培模式，本研究乃評估淹水處理對本病害發生之影響。本試驗將病藷及罹病藤蔓分別置於淹水區 1 wk 及 2 wk，再評估其是否仍具有田間感染源之能力，結果顯示病藷淹水 1 wk 後即失去作為感染源之能力，而罹病藤蔓於淹水 2 wk 以上亦喪失作為田間感染源之能力。本文據此建議，發病田區應儘量與水稻輪作，若未能種植水稻仍應執行淹水 2 wk 以上，以消滅病藷及病殘體上之菌體，避免作為下一期之感染源。另外，根據 Clark & Watson (1983) 報導指出，基腐病菌對旋花科 (Convolvulaceae) 植物如月光花 (*Ipomoea alba*)、心葉蔦蘿 (*Ipomoea hederifolia*)、白星薯 (*Ipomoea. lacunose*)、紫花牽牛 (*Ipomoea purpurea*)、大星牽牛 (*Ipomoea trichocarpa*)、槭葉小牽牛

(*Ipomoea wrightii*) 等均具有病原性，未來應避免與旋花科植物進行輪作，同時田間勿同時栽植這些植物。

綜合本研究結果，顯示甘藷基腐病之罹病病苗為本病害長距離傳播之主要來源。謹此建議農友應選擇認證之健康種苗進行栽植，而栽植過程中應隨時拔除田間罹病株並帶離田間，以減少感染源。又於可進行人工灌溉之發病田區，應於採收後與水稻進行輪作或至少淹水處理 14 d 以上。而於未能進行人工灌溉之田區，除了宣導輪作其他非寄主作物外，另於栽培時期亦需加強病株清除，以逐年降低田間病原菌之感染源。此外，建議未來仍須持續進行其他防治方法，如物理防治、化學防治或生物防治等防治策略之評估，以供防治此病害之參考。

誌謝

本研究承行政院農業委員會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系羅淑芳博士提供「台農 57 號」及「台農 71 號」健康種苗，賴永昌主任協助英文之修正，以及王晉鍾先生和林江美華女士協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

Boerema, G. H., W. M. Loerakker, and M. E. C. Hamers. 1996. Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes)-III. 2. Misapplications of the type species name and the generic synonyms of section *Plenodomus* (excluded species). Persoonia 16:141–190.

Chen, Y. J., Y. S. Lin, and W. H. Chung. 2012. Bacterial wilt of sweet potato caused by *Ralstonia solanacearum* in Taiwan. J. Gen. Plant Pathol. 78:80–84.

Chung, M. L., C. H. Liao, and L. Li. 1981. Effect of virus infection on the yield and quality of sweet potatoes. Plant Prot. Bull. 23:137–141. (in Chinese with English abstract)

Chung, M. L., C. H. Liao, M. J. Chen, and R. J. Chiu. 1985. The isolation, transmission and host range of sweet potato leaf curl disease agent in Taiwan. Plant Prot. Bull. 27:333–341. (in Chinese with English abstract)

Clark, C. A. 1994. The chlorotic leaf distortion pathogen, *Fusarium lateritium*, cross protects sweetpotato against *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas*. Biol. Control 4:59–66.

Clark, C. A. and B. Watson. 1983. Susceptibility of weed species of Convolvulaceae to root-infecting pathogens of sweet potato. Plant Dis. 67:907–909.

Clark, C. A., D. M. Ferrin, T. P. Smith, and G. J. Holmes. 2013. Compendium of Sweetpotato Diseases, Pests, and Disorders. 2nd ed. APS Press. St. Paul. 160 pp.

Harter, L. L. 1913a. Foot rot, a new disease of the sweet potato. Phytopathology 3:243–245.

Harter, L. L. 1913b. The foot-rot of the sweet potato. J. Agric. Res. 1:251–273.

Harter, L. L. and J. L. Weimer. 1929. A monographic study of sweet potato diseases and their control. U.S. Dept. Agric. Technol. Bull. 99:27–33.

Hsu, S. T., T. T. Chang, C. A. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsay. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. 4th ed. Taiwan Phytopathology Society. Taichung. 386 pp. (in Chinese)

Huang, S. H. 1993. Applied of solarization for controlling soilborne fungal disease. Spl. Publ. Taichung Dis. Agric. Improv. Sta. 32:247–256. (in Chinese)

Huang, C. W., M. F. Chuang, S. S. Tzean, H. R. Yang, and H. F. Ni. 2012. Occurrence of foot rot disease of sweet potato caused by *Phomopsis destruens* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 21:47–52. (in Chinese with English abstract)

Lopes, C. A. and J. B. C. Silva. 1993. Management measures to control foot rot of sweet potato caused by *Plenodomus destruens*. Intl. J. Pest Manage. 39:72–74.

Lopes, C. A., P. Boff, and V. Duarte. 1994. Foot rot of sweet potato in Brazil. Pesqui. Agropecu. Bras. 29:1407–1410.

Martin, W. J. 1972. Further evaluation of thiabendazole as a sweet potato seed treatment fungicide. Plant Dis. Rep. 56:219–223.

Shen, Y. M., H. S. Liu, and C. H. Chao. 2013. Analyses for the causal agent of sweet potato foot rot disease and its susceptibility on six sweet potato cultivars. Plant Prot. Bull. 55:25–34. (in Chinese with English abstract)

Yang, I. L. 1969. Studies on witchs' broom of sweet potato in Taiwan. J. Agric. Res. 18:50–60. (in Chinese with English abstract)

The Study of Physiological Characteristics and Control of *Phomopsis destruens* Causing Foot Rot of Sweet Potato

Chiao-Wen Huang[1], Hong-Ren Yang[2], Ching-Yi Lin[1], Sui-Li Hsu[3], Su-Yu Lai[3], and Hui-Fang Ni[4,*]

Abstract

Huang, C. W., H. R. Yang, C. Y. Lin, S. L. Hsu, S. Y. Lai, and H. F. Ni. 2016. The study of physiological characteristics and control of *Phomopsis destruens* causing foot rot of sweet potato. J. Taiwan Agric. Res. 65(1):45–53.

Foot rot disease is a major limiting factor for sweet potato production in recent years. In this study, foot rot of sweet potato was investigated in different growing regions of Taiwan. Results showed that the disease was harmful to commercial root-used varieties of sweet potato, 'TN57' and 'TN66', as well as vegetable-used variety, 'TN71', suggesting that the major cultivars of sweet potato in Taiwan were not resistant to the disease. The optimal temperature of mycelial growth and spore germination of *Phomopsis destruens* were 20℃ and 25–30℃, respectively. The maximum incidence of foot rot disease occurred in range of 15–30℃. The incidence of foot rot was 100% when the diseased seedlings were grown in uninoculated soil for 12 wk, suggesting that the disease seedling was a major inoculum source. Therefore, good quality of seedlings would be an important factor to control the foot rot of sweet potato in the field. However, when the field grown with diseased tuber and stem were treated with flooding for 1 wk and 2 wk, respectively, the disease incidence of foot rot was reduced to zero. As a result, the field with the foot root disease should be rotated with paddy rice annually or flooded for more than 2 wk after the previous harvest to eradicate the pathogen avoiding the infection in the next season.

Key words: Sweet potato (*Ipomoea batatas*), Foot rot disease, *Phomopsis destruens*, Disease control.

Received: April 27, 2015; Accepted: July 1, 2015.

[*] Corresponding author, e-mail: hfni@dns.caes.gov.tw

[1] Assistant Research Fellows, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[2] Research Fellow and Director, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[3] Research Assistants, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

[4] Associate Research Fellow and Head, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 65(1):54–69 (2016)
DOI: 10.6156/JTAR/2016.06501.06

研究報告

水稻抗白葉枯病突變體 SA0423 抗性表現數量性狀基因座 (eQTL) 之研究

林大鈞[1] 林玉鈴[2] 黃巧宜[3] 曾馨儀[4] 曾文彬[3] 陳純葳[5] 王強生[6,*]

摘要

林大鈞、林玉鈴、黃巧宜、曾馨儀、曾文彬、陳純葳、王強生。2016。水稻抗白葉枯病突變體 SA0423 抗性表現數量性狀基因座 (eQTL) 之研究。台灣農業研究 65(1):54–69。

為開發新的白葉枯病抗性基因，本研究針對轉錄體分析所得 17 個抗性候選基因，利用 GRAMENE 網站，檢索基因兩側 5 cM 內的 SSR 標誌，篩選於 2 親本 'TN1' (感性) 及 SA0423 突變體 (抗性) 間具多型性的標誌，針對 177 個 'TN1' × SA0423 F_2 個體進行基因型分析，並配合白葉枯病菌 XF89b 接種後病斑之外表型調查。所得資料利用 R/qtl 以單一標誌回歸分析法，分析基因型與抗性外表型的連鎖關係。結果發現，僅有鄰近 *Ankyrin* 基因之 RM6838 的 LOD 值 (6.86) 超過閥值 (LOD = 3.0)，顯示 *Ankyrin* 基因極有可能參與 SA0423 的抗性表現。生物資訊學分析發現，*Ankyrin* 之蛋白質序列與阿拉伯芥 RING 型 E3 接合酶 (XBAT32) 具有 76% 的相似性，顯示其可能透過調控 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACS) 之生合成，改變植物體內的乙烯量，而延緩植物的免疫系統。即時定量逆轉錄聚合酶鏈鎖反應 (real time RT-PCR) 分析發現，接種 *Xoo* XF89b 後，*Ankyrin* 基因在 SA0423 突變體中的表現低於 'TNG67'。同時，*OsACS1* 及 *OsACS3* 在 SA0423 突變體的表現量顯著高於 'TNG67'。這些結果顯示，SA0423 突變體在接種後可能改變乙烯生合成路徑，因而具有較強的抗病性。經選殖 *Ankyrin* 基因上下游共 11.8 kb 的 DNA 片段進行定序結果顯示，在編碼區有 15 個突變位點，導致胺基酸置換 (Ser280Pro 與 Thr381Ala)。綜合試驗結果說明，*Ankyrin* 不僅在表現量與 SA0423 白葉枯病抗性間具有高度相關，其蛋白質特性亦與 'TNG67' 顯著不同。因此，*Ankyrin* 基因應是參與 SA0423 突變體白葉枯病抗性機制的表現數量基因座 (eQTL) 之一。

關鍵詞：水稻、白葉枯病抗性、突變體、轉錄體、表現數量性狀基因座。

前言

白葉枯病 (bacterial blight disease) 係由 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 所引起，是目前台灣地區嚴重的水稻病害之一，可造成高達 50% 的減產 (Gnanamanickam *et al*. 1999)。此病好發於台灣的第 2 期稻作，尤其是在颱風頻繁的季節 (Hsieh 2007)，而抗性品種的種植被公認為最有效且經濟的防治手段 (Yang *et al*. 2003)。因此，開發抗性基因以協助抗性品種的選育更顯示其重要性。截至目前為止，在水稻品種中，已有 36 個以上的抗性基因座被發現，分別命名為 *Xa1* 至 *Xa36* (Lin *et al*. 1996; Niño-Liu *et al*. 2006; Zhang 2007; Shanti *et al*. 2010)。其中，*Xa1*、*xa5*、*xa13*、*Xa21*、*Xa3/*

投稿日期：2015 年 5 月 12 日；接受日期：2015 年 7 月 3 日。
[*] 通訊作者：wangchansen@nchu.edu.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組聘用副研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。
[3] 國立中興大學農藝學系研究助理。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[5] 農委會農業試驗所植物病理組聘用助理研究員。台灣 台中市。
[6] 國立中興大學農藝系教授。台灣 台中市。

Xa26 及 *Xa27* 等基因已被利用於選殖 (Song *et al*. 1995; Yoshimura *et al*. 1998; Iyer & McCouch 2004; Sun *et al*. 2004; Gu *et al*. 2005; Chu *et al*. 2006; Jiang *et al*. 2006; Xiang *et al*. 2006)。

國際稻米研究所 (International Rice Research Institute; IRRI) 利用極感病的 IR24 品系作為輪迴親 (recurrent parent)，建立帶有不同 *Xa* 基因的 IRBB 系列近同源系 (near-isogenic lines)，作為良好的 *Xa* 基因提供親 (donor parent) 利用於抗性育種 (Huang *et al*. 1997)。Kottapalli *et al*. (2006) 及 Sama *et al*. (2014) 利用基因圖譜比較的策略，開發許多分子標誌，可應用於改良優良品種的白葉枯病抗性 (Kottapalli *et al*. 2006; Sama *et al*. 2014)。然而，長期栽培單一抗性品種，可能會改變栽種區域的生理小種 (races) 或菌相，而導致抗性崩解，如 *Xa4* 的抗病品種在釋出後很快喪失抗性 (Khush *et al*. 1989; Mew *et al*. 1992)。因此，育種家認為堆疊多個不同抗性基因，可以減緩抗性的崩解，是目前抗病育種的主流策略。所以，篩選新的抗性種原與開發新的抗性基因，以因應菌相的演化，是抗病育種的重要工作 (Wang *et al*. 2013)。

本研究利用「台農 67 號」(‘TNG67’) 及其廣幅抗性之 SA0423 突變體為材料，接種台灣水稻白葉枯病抗性檢定圃專用菌株 XF89b，利用微陣列分析兩品種 (系) 於接種後的轉錄體表現之差異，探討病原菌誘導與抗性相關之早期基因 (Huang *et al*. 2015)。另一方面，結合微陣列分析全基因組的表現群組 (genome-wide expression profiles) 與遺傳連鎖分析 (genetic linkage analysis) 等技術，針對重要的數量性狀進行表現數量性狀基因座 (expression quantitative trait loci; eQTLs) 探索，進而剖析參與特定性狀表現的機制，甚至藉此開發功能性分子標誌 (functional marker)，直接應用於育種選拔，此策略亦被稱為轉錄體定位 (transcriptome mapping) (Jansen & Nap 2001; Jansen 2003; Holloway & Li 2010)。

本研究針對先前轉錄體分析所得的候選基因 (Huang *et al*. 2015)，利用 GRAMENE 網站搜尋目標基因兩側 5 cM 的 SSR 分子標誌，分析 177 個 ‘TN1’ × SA0423 F_2 個體，探討候選基因與抗性的連鎖關係。所得結果，除可作為候選基因的確認與研究抗性機制的推論外，亦可研發分子標誌應用於水稻白葉枯病抗性的分子育種。

材料與方法

試驗材料

本研究選用對白葉枯病極敏感的水稻品種「台中在來 1 號」(‘TN1’) (susceptible, S) 與具廣幅抗性之突變體 SA0423 (resistant, R) 及其雜交組合 ‘TN1’ × SA0423 之 F_2 族群為材料。所有試驗材料均依慣行農法，種植於行政院農業委員會農業試驗所試驗田。白葉枯病菌則以農業試驗所植病組稻作病害實驗室所保存的白葉枯病 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* XF89b (*Xoo* XF89b；採集地：台中) 作為供試菌株。

白葉枯病菌之接種源製備、接種與病勢調查

在接種源製備方面，將 *Xoo* XF89b 於室溫下於 523 固態培養基 (1% sucrose、0.8% casein hydrolysate、0.4% yeast extract、0.2% K_2HPO_4、0.03% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 及 1.5% agar) 活化培養 72 h 後，再挑取單一菌落接種於新鮮培養基，於室溫下進行馴化培養 72 h，接著轉移至 523 液態培養基 (1% sucrose、0.8% casein hydrolysate、0.4% yeast extract、0.2% K_2HPO_4 及 0.03% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)。於室溫下、150 rpm 震盪培養 72 h。調整菌液濃度為 10^9 CFU mL^{-1}，作為白葉枯病菌之接種源。

供試水稻植株於最高分櫱期 (maximum tillering stage，約 60 d)，依據剪葉接種法 (Kauffman *et al*. 1973)，進行病原菌接種。接種前，先將消毒的剪刀刀刃沾滿接種菌液，進行人工剪葉接種，每個分櫱僅接種最上位之完全展開葉，距葉尖 1–2 cm 處，剪葉接種。所有接種均在 1 h 內完成。並在感性對照品種 ‘TN1’ 之病斑長度達全葉 3/4 時，調查試驗植株之病斑，作為抗性外表型資料。

基因體 DNA 樣品之製備

總量 DNA 之萃取，以 GeneReach Biotechnology Corporation 公司製造之植物 DNA/RNA 萃取套組 (瑞基海洋生技公司，台灣)，並搭配 Taco™ 核酸自動化萃取系統 (瑞基海洋生技公司，台灣) 萃取 DNA。剪取 0.05–0.1 g 水稻葉片，置於 2 mL 之防爆離心管內，加入 3 顆直徑 3 mm 鋼珠，再以 Taco™ Prep 均質機 (瑞基海洋生技公司，台灣) 震盪破碎約 1 min。接著，加入 600 µL 的裂解液 (lysis buffer)，震盪 30 s，混合後，於室溫、12,000× *g* 條件下，離心 5 min。另一方面，依序於 96 孔萃取盤分別加入 400 µL 異丙醇 (isopropanol)、750 µL 清洗液 A (washing buffer A)、50 µL 磁珠液 (magnetic bead)、750 µL 清洗液 A、750 µL 清洗液 B、750 µL 清洗液 B 及 150 µL 溶出液 (eluting buffer)。接著，將上述離心之上清液，依序填入 96 孔萃取盤中的異丙醇管，即利用 taco™ 核酸自動化萃取系統，進行 DNA 的製備。所得DNA樣品再以分光光度計 (ND-1000, NanoDrop Technologies, USA) 及 DNA 電泳，進行 DNA 的濃度與品質之分析。

鄰近目標抗性基因之 SSR 分子標誌搜尋

利用 Gramene 網站 (http://archive.gramene.org/; Gramene Release 39, 10/2013) 進行搜尋。首先，利用候選基因的序號 (例：LOC_Os06g13050) 搜尋候選基因在染色體的位置，設定分子標誌類型為 SSR，涵蓋區間設定為 5 cM，即能搜尋目標候選基因兩側 5 cM 的 SSR 分子標誌 (表 1)。

表 1. 鄰近候選基因兩側 5 cM 內之 SSR 分子標誌。

Table 1. The SSR markers located in 5 cM region flanking to the candidate genes.

Gene	Position	SSR marker
Ankyrin	Up	RM3214, RM3215, RM3481, RM6027, RM6429, RM6838, RM8243, RM22669, RM22675, RM22684, RM22690, RM22696, RM22707, RM22715
	Down	RM344, RM3395, RM5514, RM5663, RM7267, RM22725, RM22742, RM22754, RM22761, RM22771, RM22779
ATG1	Up	RM147, RM484, RM4477, RM5009, RM5352, RM5628, RM6128, RM6691, RM25737, RM25743, RM25751, RM25761, RM25769, RM25776, RM25789, RM25794, RM25803
	Down	RM228, RM333, RM496, RM1162, RM1374, RM3123, RM3451, RM3563, RM3749, RM3750, RM3834, RM5009, RM5471, RM5494, RM5666, RM5768, RM6160, RM6960, RM25810, RM25818, RM25823, RM25829, RM25834, RM25844, RM25853, RM25859, RM25868, RM25885, RM25905
CaM_Chr.1-1	Up	RM243, RM575, RM576, RM577, RM578, RM579, RM581, RM582, RM583, RM1151, RM3359, RM3780, RM5346, RM6466, RM6516, RM6630, RM8083, RM8091, RM8092, RM8093, RM8103, RM8140, RM8141, RM8148, RM8222, RM8268, RM10498, RM10518, RM10525, RM10533, RM10544, RM10551, RM10567, RM10573
	Down	RM292, RM294, RM572, RM580, RM600, RM1032, RM3627, RM5644, RM6039, RM6190, RM6613, RM6642, RM8046, RM8052, RM8053, RM8063, RM8065, RM8066, RM8071, RM8123, RM8131, RM8132, RM8133, RM10587, RM10601, RM10616, RM10628, RM10635, RM10644, RM10654, RM10660
CaM_Chr.1-2	Up	RM292, RM572, RM580, RM581, RM582, RM600, RM1032, RM5346, RM5644, RM6039, RM6190, RM6466, RM6613, RM6642, RM8052, RM8053, RM8063, RM8065, RM8066, RM8071, RM8083, RM8091, RM8092, RM8093, RM8123, RM8131, RM8132, RM8133, RM8222, RM8268, RM10544, RM10551, RM10567, RM10573, RM10587, RM10601, RM10616
	Down	RM294, RM1287, RM3627, RM8046, RM10628, RM10635, RM10644, RM10654, RM10660, RM10665, RM10683, RM10695, RM10702, RM10712
CaM_Chr.2	Up	RM555, RM1347, RM2008, RM3294, RM3497, RM3732, RM3865, RM4355, RM4949, RM5301, RM5350, RM5512, RM5553, RM5622, RM5664, RM5780, RM5869, RM6112, RM6129, RM6230, RM6378, RM6641, RM6654, RM6895, RM7082, RM7215, RM7638, RM8080, RM12569, RM12576, RM12583, RM12589, RM12594, RM12606, RM12616, RM12625, RM12632, RM12642, RM12649, RM12656
	Down	RM2483, RM4702, RM5862, RM5897, RM6069, RM6233, RM6247, RM7006, RM7575, RM12666, RM12672, RM12680, RM12687, RM12699, RM12708, RM12720, RM12730

表 1. 鄰近候選基因兩側 5 cM 內之 SSR 分子標誌 (續)。

Table 1. The SSR markers located in 5 cM region flanking to the candidate genes (continued).

Gene	Position	SSR marker
CaM_Chr.5	Up	RM421, RM534, RM1187, RM3476, RM3673, RM3870, RM5311, RM5575, RM5947, RM5970, RM5973, RM6054, RM6188, RM18842, RM18859, RM18866, RM18875, RM18884, RM18895, RM18905
	Down	RM178, RM1869, RM3348, RM3612, RM3620, RM4641, RM5770, RM6334, RM6545, RM6972, RM7081, RM7446, RM18912, RM18919, RM18925, RM18933, RM18951, RM18959, RM18965
CMPG1	Up	RM6, RM318, RM530, RM3275, RM3316, RM3421, RM5303, RM5378, RM5472, RM5993, RM6290, RM6295, RM6424, RM6933, RM7598, RM13871, RM13878, RM13883, RM13907, RM13912, RM13923, RM13928, RM13938
	Down	RM112, RM240, RM425, RM2578, RM2848, RM3857, RM4883, RM6535, RM8255, RM13945, RM13950, RM13963, RM13971, RM13978, RM13986, RM13995
DUF_1c	Up	RM1048, RM1973, RM2420, RM3404, RM3826, RM5009, RM5009, RM6011, RM21739, RM21753, RM21764, RM21771
	Down	RM336, RM455, RM1017, RM1279, RM2752, RM2848, RM3608, RM3799, RM5495, RM6152, RM6278, RM6403, RM21780, RM21786, RM21801, RM21823, RM21835
FMO	Up	RM111, RM115, RM1163, RM2434, RM2848, RM3034, RM3408, RM4608, RM5986, RM6119, RM6176, RM6734, RM6773, RM6917, RM7420, RM7561, RM8258, RM19458, RM19467, RM19478, RM19484, RM19491, RM19514, RM19521, RM19535, RM19548
	Down	RM253, RM276, RM2126, RM3794, RM4173, RM5754, RM5981, RM6194, RM19556, RM19565, RM19573, RM19581, RM19588, RM19596, RM19602, RM19609, RM19618, RM19626
JOM	Up	RM348, RM1153, RM3306, RM3335, RM3648, RM5478, RM5506, RM5950, RM6057, RM6238, RM6441, RM8217, RM8218, RM17549, RM17554, RM17568, RM17578, RM17586, RM17594, RM17599, RM17604
	Down	RM131, RM1112, RM1113, RM2275, RM2420, RM2799, RM3466, RM5307, RM7172, RM7314, RM7410, RM7474, RM8220, RM17616, RM17624, RM17634, RM17644
PxMP	Up	RM1246, RM2486, RM2848, RM2972, RM5195, RM5196, RM5341, RM28231, RM28247, RM28259, RM28270, RM28276
	Down	RM519, RM2848, RM3448, RM6022, RM28283, RM28292, RM28305, RM28319, RM28328
SAM	Up	RM276, RM402, RM549, RM3125, RM3370, RM4128, RM5531, RM5981, RM6194, RM6359, RM6701, RM6779, RM6857, RM7023, RM7088, RM7488, RM8270, RM8274, RM19618, RM19626, RM19637, RM19646, RM19653, RM19671, RM19676, RM19684
	Down	RM1169, RM3438, RM5585, RM5855, RM7572, RM19696, RM19705, RM19710, RM19715, RM19724, RM19730, RM19736, RM19748
SNARE	Up	RM134, RM429, RM1209, RM1364, RM3552, RM5455, RM6216, RM6650, RM22017, RM22024, RM22032, RM22041, RM22051, RM22062, RM22071
	Down	RM1306, RM1335, RM1357, RM1362, RM2420, RM2715, RM3555, RM5720, RM6063, RM6389, RM6655, RM22080, RM22086, RM22092, RM22098, RM22132, RM22143
Ubi	Up	RM147, RM484, RM3773, RM5009, RM6128, RM6691, RM7300, RM25719, RM25731, RM25737, RM25743, RM25751, RM25761, RM25769, RM25776, RM25789, RM25794
	Down	RM228, RM333, RM1162, RM1374, RM3123, RM3451, RM3563, RM3749, RM3750, RM3834, RM4477, RM5009, RM5352, RM5471, RM5628, RM5666, RM25803, RM25810, RM25818, RM25823, RM25829, RM25834, RM25844, RM25853, RM25859, RM25868
Xa2	Up	RM255, RM3276, RM3423, RM3534, RM5030, RM5511, RM6748, RM6992, RM17465, RM17471, RM17479, RM17487
	Down	RM1100, RM3687, RM3836, RM3843, RM5473, RM5771, RM6629, RM17492, RM17504, RM17512
xa5	Up	RM122, RM153, RM2494, RM5816, RM7373, RM17724, RM17732, RM17741, RM17746
	Down	RM159, RM1200, RM1258, RM3334, RM4777, RM5361, RM5693, RM6209, RM6300, RM6320, RM7029, RM17756, RM17770, RM17777, RM17784
Xa25	Up	RM179, RM465, RM2848, RM28057, RM28069, RM28075, RM28083, RM28089, RM28098, RM28107, RM28128
	Down	RM511, RM1261, RM3495, RM6564, RM28157, RM28172, RM28189, RM28204, RM28214, RM28221, RM28231

SSR 分子標誌之分析

進行 SSR 分子標誌分析時，每一個 PCR 反應的總體積為 10 μL，其中包含 20 ng DNA、0.6 U *Taq* DNA polymerase (ProTag™, Protech Technology Enterprise Co., Ltd.)、*Taq* buffer (10 mM Tris-HCl、50 mM KCl、0.01% gelatin、1.5 mM $MgCl_2$ 及 0.1% Triton X-100)、200 μM dNTP、0.4 μM 正向引子和 0.4 μM 反向引子。PCR 反應在熱循環反應器 (DNAEngine® Peltier Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Inc.) 中進行，反應條件為 94℃、5 min；94℃、1 min；55℃、30 s；72℃、1 min，共 30 個循環；72℃、4 min，1 個循環；反應結束後以 15℃保存 PCR 產物。

將 3 組 SSR 增幅的 PCR 產物，各取 5 μL 混合均勻後，依序放入 96 孔盤，續以高效能毛細管電泳儀 (eGene HAD-GT12, QIAGEN Co., Ltd.) 及卡匣 (型號：QIAxcel DNA High Resolution Kit 1200, QIAGEN Co., Ltd.)，依廠商說明書的操作流程，進行基因型的分析。所用之操作軟體為 QIAxcel ScreenGel (QIAGEN Co., Ltd.)；Size marker 為 50–800 bp (20 ng μL^{-1}; QIAGEN Co., Ltd.)；Alignment marker 為 QX 15 bp–1 kb (QIAGEN Co., Ltd.)。

候選基因與抗病性之連鎖分析

抗性外表型係調查分析 177 個 ‘TN1’ × SA0423 F_2 個體，於接種 *Xoo* XF89b 後第 28 d 的病斑長度，作為抗性外表型資料。利用上述位於目標基因 5 cM 內，且於兩親本間具多型性的 SSR 分子標誌，進行 F_2 個體之基因型分析。最後，利用 R/qtl (ver. 3.1.0; http://www.r-progect.org/) (Broman *et al*. 2003; Broman & Sen 2009) 之單一標誌回歸分析法 (single marker regression, SMR) (Haley & Knott 1992)，分析外表型與基因型間的連鎖關係。

即時逆轉錄聚合酶連鎖反應 (real-time RT-PCR)

使用 SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) 試劑組將總量 RNA 反轉錄成 cDNA：加 1 μL 10 mM oligo d (T) 18 引子 (附錄 1) 於 2 μg 總量 RNA 樣品，經 80℃、10 min 變性後，隨即置於 4℃下，再逐一加入 1 μL 0.1 M DTT、4 μL 2.5 mM dNTP (TaKaRa)、4 μL 5× first-strand buffer、1 μL RNaseOUT、1 μL SuperScript II (200 U μL^{-1})，並調整總體積為 20 μL。於 25℃、10 min 及 42℃、90 min 作用後，再以 95℃、5 min 終止反應，所得即為 cDNA。接著再以 KAPA™ SYBR® FAST qPCR 試劑組進行 PCR，取 4 μL 稀釋 20 倍的 cDNA，加入 10 μL 2× master mix、0.4 μL 10 μM 引子 (附錄 1)、0.4 μL 50× ROX low 及 4.8 μL 去離子水，置於多重螢光基因定量光譜分析儀 (ABI 7500, Life Technologies Co., Ltd.)，進行即時定量 PCR。PCR 條件設定如下：95℃、2 min 30 s，將模版變性；接著，進行增幅階段，95℃變性 30 s，黏合反應於 60℃下進行 30 s，72℃聚合反應 32 s，此反應進行 40 次循環。最後，進行解離反應 (dissociation)：95℃、15 s，60℃、1 min。

基因組 DNA 片段之選殖與序列分析

首先從 Gramene 網站 (Gramene Release 39, 10/2013)，下載候選基因及其上下游各 5 Kb 的序列，以 SoftBerry 網站 (http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=case_study_plants) 預測啟動子 (promoter) 及轉錄因子結合位置 (transcription factorbinding site)，從啟動子位置開始，每 4 Kb 設計一個正向及一個反向引子 (附錄 2)，共有 3 段。PCR 擴增時，反應體積為 25 μL，其中包含 200 ng DNA、0.6 U *Taq* DNA polymerase (TaKaRa Ex Taq™) 和 *Taq* buffer、200 μM dNTP、0.4 μM 正向引子、0.4 μM 反向引子。PCR 反應在前述熱循環反應器中進行，反應條件為 95℃、2 min 30 s；95℃、30 s、60℃、30 s、72℃、3 min，共 25 個循環；72℃ 7 min，一個循環；反應結束後於 15℃保存擴增產物。

所得 PCR 產物以 0.8% 0.5× TAE 洋菜膠進行電泳分析，確認大小正確後，即將 DNA 條帶所在的膠體切下來，以 QIAquick Gel Extraction 試驗套組 (QIAGEN Co. Ltd.)，以廠商建議之操作流程，進行目標 DNA 的回收。回

收所得 DNA 產物，取 1 μL 進行電泳分析，估算品質及濃度。接著，將上述目標片段次選殖至 pGEM-T easy vector 系統 (Promega Co.)，所得黏合產物，再依 Chung *et al*. (1989) 所發表方法，轉形至大腸桿菌 JM109，經藍白篩選後，挑選白色菌落，進行重組質體 DNA 抽取及 *Eco* RI 限制酵素剪切，確認正確的重組質體，再利用 T7 及 SP6 引子，進行插入 DNA 定序。所得插入DNA序列先以 Vector NTI (ver 8.0; Invitrogen) 進行序列拼接 (contig)，再利用 SDSC web site (https://www.sdsc.edu/) 的生物資訊學工具進行序列比對分析。

結果與討論

目標抗性基因兩側之 SSR 標誌搜尋與多型性分析

利用轉錄體學及生物資訊學等分析方法，我們發現有 17 個基因可能與 SA0423 的抗病性有關 (表 1) (Huang *et al*. 2015)。本研究利用 GRAMENE 網站資料庫，針對這些候選基因，搜尋基因兩側的 SSR 分子標誌 (表 1) 進行多型性分析。由於水稻的遺傳圖譜已近飽和，因此每個基因的上、下游均可搜尋到至少 9 個 SSR 分子標誌，可供基因型分析。

連鎖分析的材料為利用極感品種「台中在來一號」(‘TN1’) 與 SA0423 雜交所得的 F_2 族群 (Tseng *et al*. 2015)。首先將上述搜尋所得之 SSR 標誌，進行 ‘TN1’ 及 SA0423 兩親本的多型性分析 (圖 1)，發現 RM6838、RM5352、RM8123、RM572、RM6378、RM421、RM13938、RM3862、RM19556、RM17604、RM3448、RM7488a、RM22086、RM147、RM3843、RM28157 及 RM17741 等 SSR 在 ‘TN1’ 及 SA0423 呈現多型性 (表 2)。

表現數量基因座 (eQTLs) 與抗性之連鎖分析

為探討這些目標基因與 SA0423 抗性間的連鎖關係，挑選 177 個 ‘TN1’ × SA0423 F_2 個體 (圖 2)，並利用兩親本多型性的 SSR (表 2) 進行基因型分析 (圖 3)，再配合抗性外表型調

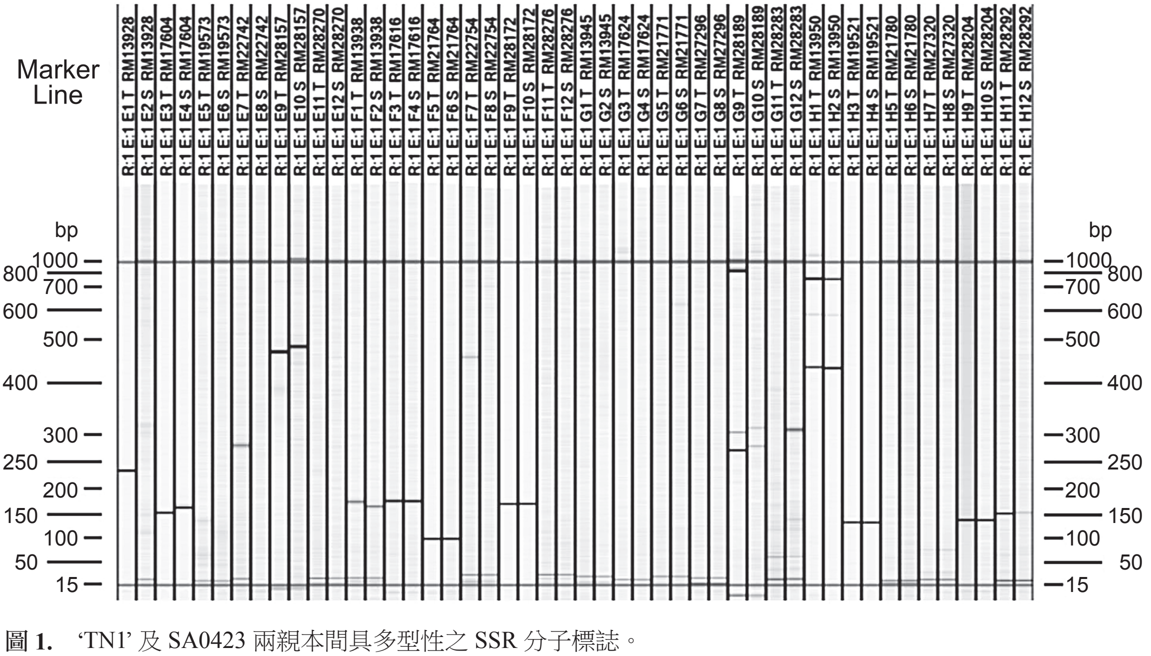


圖 1. ‘TN1’ 及 SA0423 兩親本間具多型性之 SSR 分子標誌。

Fig. 1. The polymorphic SSR markers between ‘TN1’ and SA0423 analyzed with E-Gene system. T represents ‘TN1’ and S represents SA0423.

表 2. 抗性候選基因與 SA0423 抗病性之連鎖分析。

Table 2. Linkage analysis between the resistance gene candidates and the resistance trait of SA0423.

Gene	Chromosome	Position (cM)	Marker	LOD[z]
CaM_Chr.1-1	1	50.8	RM6039	0.8941
CaM_Chr.1-2	1	50.9	RM572	1.7618
CaM_Chr.2	2	25.3	RM6378	0.0886
CMPG	2	131	RM13938	0.5618
Xa2	4	107.4	RM17492	1.2685
JOM	4	120.3	RM17604	0.5006
xa5	5	3	RM17741	0.2725
CaM_Chr.5	5	104.7	RM6972	0.5717
FMO	6	19.1	RM19556	0.2034
SAM	6	33.5	RM276	0.1920
DUF26	7	73.2	RM3826	0.1547
SNARE	7	116.1	RM1362a	0.2325
Ankyrin	8	42.9	RM6838	6.8579
ATG	10	73.7	RM5471a	0.0479
Ubi	10	99.8	RM147	0.2880
Xa25	12	57.9	RM28157	0.4657
PxMP	12	69.6	RM519	0.2940

[z] LOD: Log_{10} of odds.

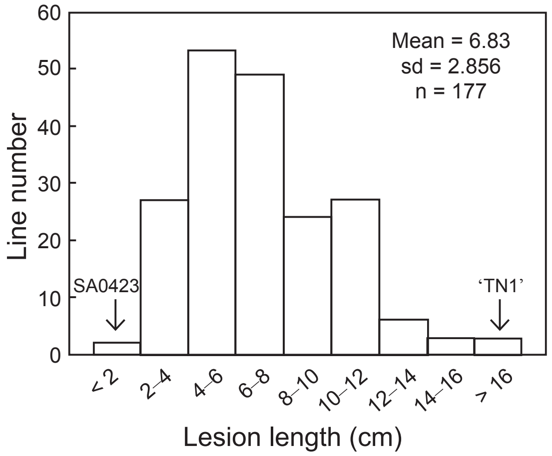


圖 2. 'TN1' 與 SA0423 突變體雜交 F_2 族群接種白葉枯病菌後病斑長度之頻佈圖。

Fig. 2. Distribution of lesion length (cm) after inoculation with Taiwanese *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* XF89b in the F_2 population of 'TN1' × SA0423 containing 177 individuals.

查結果，利用 R/qtl (ver. 3.1.0)，以單一標誌回歸模式，分析這些分子標誌的基因型與抗性外表型資料的連鎖關係，以確認候選基因參與抗性機制的可能性。結果發現，僅有 *Ankyrin* 鄰近 RM6838 的 LOD 值為 6.86，超過門檻值 (LOD = 3) (表 2)，顯示此基因與 SA0423 抗

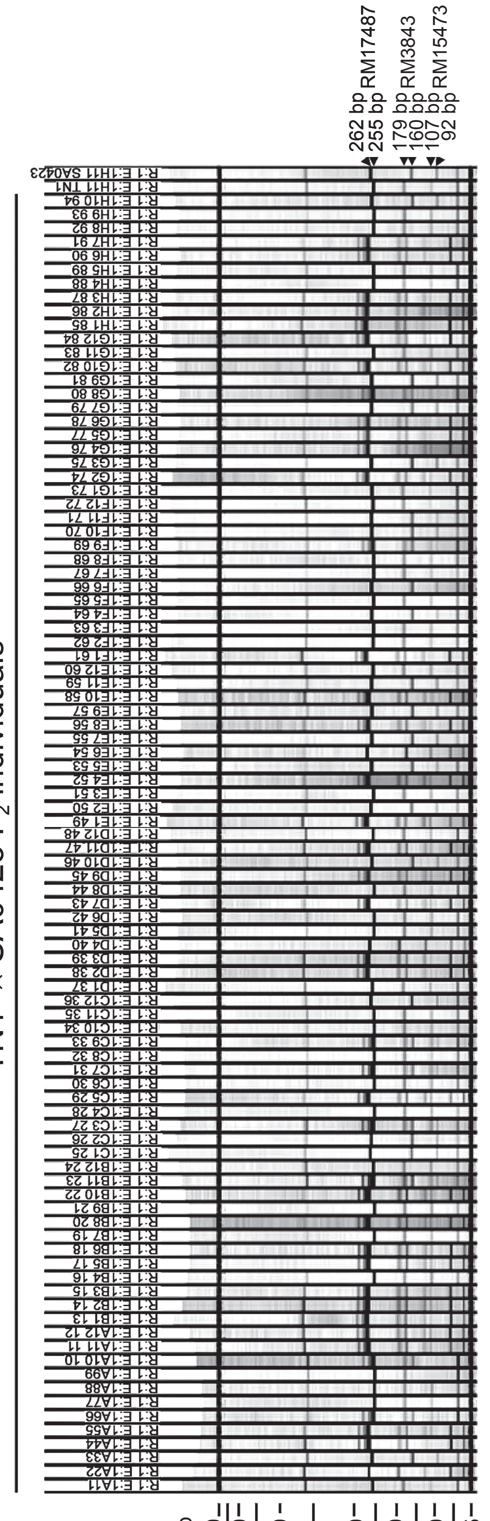


圖 3. 利用 eGENE 毛細管電泳系統進行 'TN1' × SA0423 F_2 個體之 SSR 標誌之基因型分析。

Fig. 3. The SSR genotyping of 'TN1' × SA0423 F_2 individuals using eGENE system.

性呈連鎖。由微陣列與連鎖分析結果顯示，*Ankyrin* 基因極可能參與 SA0423 的白葉枯病抗性機制。

目前已知植物細胞內有一群含 Ankyrin motif 的基因家族，如 *XB* 基因家族。本研究所發現的水稻 *Ankyrin* 基因 (LOC_Os08g15840)，其蛋白質序列與阿拉伯芥 *XB* 基因家族比對的結果顯示，其與阿拉伯芥 RING 型 E3 接合酶 (XBAT32) 蛋白質序列間具有 76% 相似性，可知它們在植物細胞中可能扮演著相似的生理功能。而阿拉伯芥 *XBAT32* 之功能為負調控乙烯生合成的關鍵酵素 ACS7 (1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 7) 在細胞內的含量，進而導致乙烯在植物體的累積量降低 (Lyzenga *et al*. 2012)。乙烯是一種植物賀爾蒙，與生物逆境的反應有關，特別是在真菌類毒性或是細菌性病原的抗性中，扮演著訊號化合物的角色 (Ecker & Davis 1987; Feys & Parker 2000; Lorenzo *et al*. 2003)。Helliwell *et al*. (2013) 發現於水稻中大量表現 *OsACS2* 基因，可使乙烯累積量增加，導致水稻對 *Magnaporthe oryzae* (稻熱病菌) 與 *Rhizoctonia solani* (紋枯病菌) 呈現抗性。然而，Shen *et al*. (2011) 將水稻的 *OsDER* 基因進行刪減表現，發現乙烯的累積會有負調控白葉枯病抗性的現象，此結果與許多阿拉伯芥相關研究呈現相反的結論 (Rober-Seilaniantz *et al*. 2011)。乙烯對於植物抗性的調控，可能需要配合其他植物賀爾蒙的協同作用 (Yang *et al*. 2013)。另一方面，學者發現在阿拉伯芥與番茄體內的乙烯含量對與白葉枯病菌同屬之 *Xanthomonas campestris* 病原菌之抗性呈正相關 (Bent *et al*. 1992; Ciardi *et al*. 2000)。由這些結果可推論，乙烯確實參與水稻白葉枯病的抗性機制，但仍需更多的研究證據，方能釐清其在白葉枯病抗性機制中所扮演的角色。在微陣列的轉錄體分析發現，接種後 SA0423 突變體的 *Ankyrin* 基因表現量下降，而 *OsACS* 同源基因 (LOC_Os01g09700, *OsACS1*; LOC_Os03g51740, *OsACS2*; LOC_Os04g48850; *OsACS3*) 表現量則上升。這些結果說明，抗病突變體 SA0423 可能在接種 *Xoo* XF89b 後，其植株內的乙烯生合成，可能受 *OsACS* 同源基因表現量的不同而較 ‘TNG67’ 更具抗性。

Ankyrin 基因之選殖與特性分析

為確認 SA0423 突變體 *Ankyrin* 及 *ACS* 同源基因的表現，利用 real time RT-PCR 偵測 *Ankyrin* 及 *OsACS* 同源基因於 ‘TNG67’ 及 SA0423 於接種 *Xoo* XF89b 後的表現量，結果發現 SA0423 *Ankyrin* 基因的表現低於 ‘TNG67’，然而 *OsACS1* 及 *OsACS3* 表現量較高，*OsACS2* 則無明顯差異 (圖 4)。這些基因的表現情形，說明 SA0423 *OsACS* 基因之表現量可能與 ‘TNG67’ 植物體內不同，而改變水稻植體內乙烯的生合成量，進而導致 SA0423 突變體對白葉枯病菌的抗性改變。

經選殖、定序並比較 ‘TNG671’、‘TN1’ 及 SA0423 突變體的 *Ankyrin* 基因序列 (約 11.8 kb) 結果發現，在啟動子的序列沒有改變，但在其他位置則有 29 個鹼基發生 transition 及 transversion 的變異 (表 3)。其中，有 15 個變異位於編碼區，導致 2 個蛋白質殘基 Ser280Pro 與 Thr381Ala 發生胺基酸的置換。目前，*Ankyrin* 蛋白質結構仍未被解析，因此無法利用結構模擬 (modeling) 的方式，來探討突變對蛋白質結構與功能的影響。但兩個突變位點取代殘基的側鏈基團 (side chain) 與原始殘基的側鏈基團，具有截然不同的性質。推測這些突變應該會促使蛋白質結構發生改變，進而影響功能。尤其，Proline 是個定向的殘基，可能會限制結構的彈性，進而影響蛋白質的功能 (Perálvarez-Marín *et al*. 2006)。由這些結果可得知，*Ankyrin* 不僅在基因表現、遺傳連鎖皆與 SA0423 白葉枯病抗性具有高度相關，其蛋白質特性亦與 ‘TNG67’ 野生型明顯不同。因此，*Ankyrin* 應是參與抗病突變體 SA0423 之白葉枯病抗性機制的表現數量基因座 (eQTL)。

結論

一般參與植物性狀的功能基因，若為質的遺傳 (qualitative inheritance)，可利用基因轉

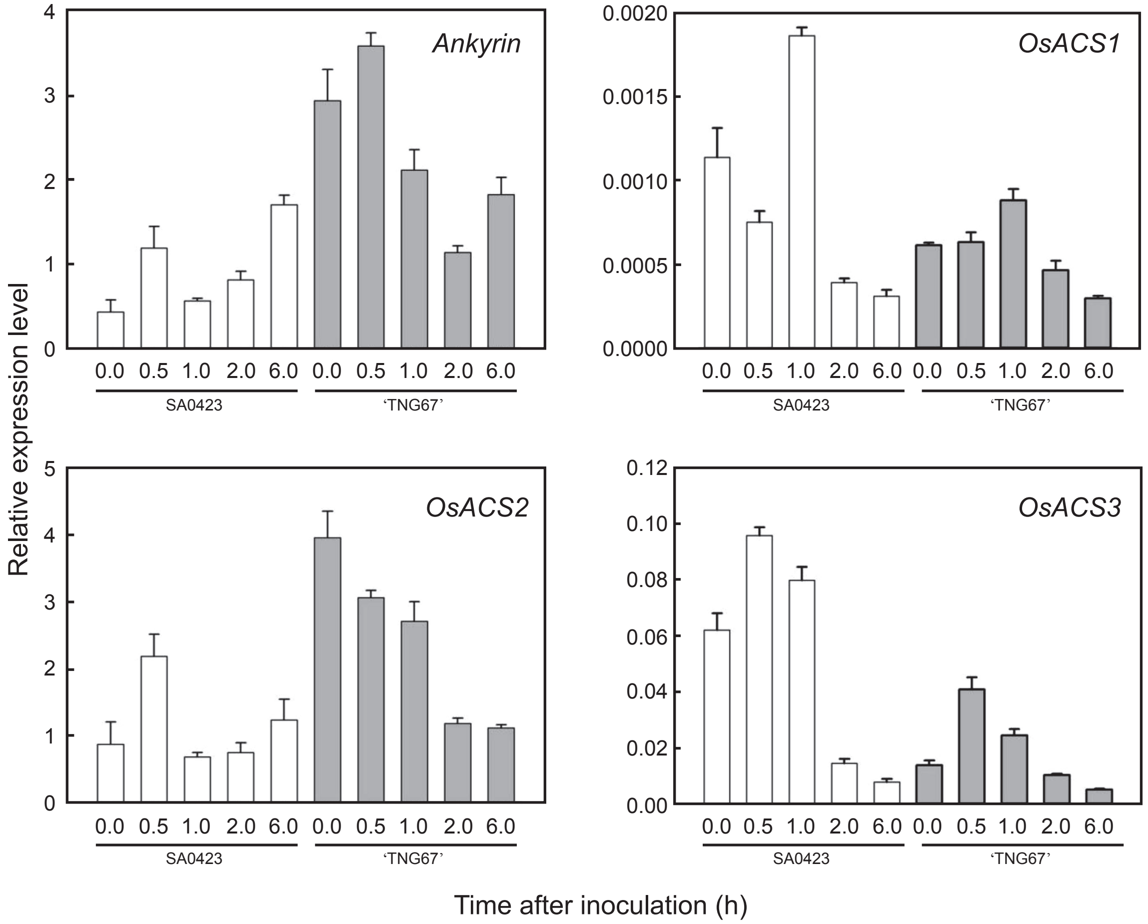


圖 4. 利用即時逆轉錄聚合酶連鎖反應分析 'TNG67' 及 SA0423 突變體於接種 XF89b 後 *Ankyrin* 及 *OsACS* 同源基因群 mRNA 之表現。

Fig. 4. Quantitative analysis of mRNA expression of *Ankyrin* and *OsACS* homologs in 'TNG67' and SA0423 after inoculated with XF89bby using real-time RT-PCR.

殖技術，以大量表現或 RNAi 靜默表現等基因轉殖策略進行功能探討；或利用與其突變體雜交進行互補性測驗，以驗證其功能 (Doebley *et al*. 1997; Waterhouse & Helliwell 2003; Salvi & Tuberosa 2005)。許多高經濟價值的性狀為數量性狀 (quantitative trait) 的遺傳模式。白葉枯病抗性即為典型的數量性狀 (Holland 2007; St. Clair 2010)，受小效應的多基因 (polygenes) 所調控，同時易受環境因子的影響 (Mather 1941)。對於性狀貢獻度較小的數量性狀基因座，較難以上述策略進行基因功能驗證。本研究針對前期轉錄體分析所得之 17 個可能的抗性候選基因 (Huang *et al*. 2015)，利用連鎖分析，探討這些基因參與 SA0423 抗性機制的可能性。結果發現僅有 *Ankyrin* 基因通過閥值，顯示此基因可能參與 SA0423 突變體的白葉枯病抗性表現。生物資訊學分析顯示，由於 Ankyrin 蛋白質與阿拉伯芥 XBA32 蛋白質間具 76% 的相似性，顯示其可能與阿拉伯芥 XBA32 蛋白質功能類似，具有調控乙烯生合成的功能 (Ecker & Davis 1987; Feys & Parker 2000; Lorenzo *et al*. 2003; Lyzenga *et al*. 2012; Huang *et al*. 2015)。而微陣列與 real time RT-PCR 分析結果，亦發現接種

表 3. SA0423 突變體抗性候選基因 *Ankyrin* 序列的突變型式與比率。

Table 3. The type and rate of mutations occurred in the resistance gene, *Ankyrin*, of resistance mutant, SA0423.

	Substitution										
	Transition		Transversion								
Mutation	AT-GC	GC-AT	AT-TA	AT-CG	GC-TA	GC-CG	Insertion	Deletion	Total	Silent	Missense
Mutations occurred in genomic DNA sequences (4,619 bps)											
No. (bp)	17	19	7	2	5	2	3	3	58		
Rate (%)	0.37	0.41	0.15	0.04	0.11	0.04	0.06	0.06	1.26		
Total rate (%)	0.78			0.35							
Mutations occurred in cDNA sequence (1,856 bps)											
No. (bp)	11	8	4	2	2	2	0	0	29		
Rate (%)	0.59	0.43	0.22	0.11	0.11	0.11	0	0	1.56		
Total rate (%)	1.02			0.54							
Mutations occurred in amino acid sequences (495 residues)											
No. (aa)										13	2
Rate (%)										2.63	0.40

Xoo XF89b 後，SA0423 突變體的 *Ankyrin* 基因表現量較低，而其下游的 *OsACS* 同源基因之表現則高於 'TNG67'。由這些結果推論，SA0423 突變體內可能因 *Ankyrin* 基因表現的改變，改變下游的 OsACS 酵素含量，進而改變乙烯的生合成，導致植物體對白葉枯病菌抗性的增強。目前，對於 'TNG67' 及 SA0423 突變體於接種白葉枯病菌後植物體乙烯含量的變化，仍須進一步試驗分析，以瞭解乙烯在水稻白葉枯病抗性機制中所扮演之角色。本研究結果可確認 *Ankyrin* 基因為白葉枯病抗性突變體 SA0423 的表現數量性狀基因座 (eQTLs) 之一，現已應用於白葉枯病抗性的分子育種。

引用文獻

Bent, A. F., R. W. Innes, J. R. Ecker, and B. J. Staskawicz. 1992. Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. Mol. Plant Microbe Interact. 5:372–378.

Broman, K. W. and Ś. Sen. 2009. A Guide to QTL Mapping with R/qtl. Springer. New York. 396 pp.

Broman, K. W., H. Wu, Ś. Sen, and G. A. Churchill. 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. Bioinformatics 19:889–890.

Chu, Z., M. Yuan, J. Yao, X. J. Ge, B. Yuan, C. G. Xu, X. H. Li, B. Y. Fu, Z. K. Li, J. L. Bennetzen, Q. F. Zhang, and S. Wang. 2006. Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. Genes Dev. 20:1250–1255.

Chung, C. T., S. L. Niemela, and R. H. Miller. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2172–2175.

Ciardi, J. A., D. M. Tieman, S. T. Lund, J. B. Jones, R. E. Stall, and H. J. Klee. 2000. Response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression. Plant Physiol. 123:81–92.

Doebley, J., A. Stec, and L. Hubbrad. 1997. The evolution of apical dominance in maize. Nature 386:485–488.

Ecker, J. R. and R. W. Davis. 1987. Plant defense genes are regulated by ethylene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5202–5206.

Feys, B. J. and J. E. Parker. 2000. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. Trends Genet. 16:449–455.

Gnanamanickam, S. S., V. B. Priyadarisini, N. N. Narayanan, P. Vasudevan, and S. Kavitha. 1999. An overview of bacterial blight disease of rice and strategies for its management. Curr. Sci. 77:1435–1443.

Gu, K., B. Yang, D. Tian, L. Wu, D. Wang, C. Sreekala, F. Yang, Z. Chu, G. L. Wang, F. F. White, and Z. Yin. 2005. *R* gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. Nature 435:1122–1125.

Haley, C. S. and S. A. Knott. 1992. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. Heredity 69:315–324.

Helliwell, E. E., Q. Wang, and Y. Yang. 2013. Transgenic rice with inducible ethylene production exhibits broad-spectrum disease resistance to the fungal pathogens *Magnaporthe oryzae* and *Rhizoctonia solani*. Plant Biotechnol. J. 11:33–42.

Holland, J. B. 2007. Genetic architecture of complex traits in plants. Curr. Opin. Plant Biol. 10:156–161.

Holloway, B and B. Li. 2010. Expression QTLs: Applications for crop improvement. Mol. Breeding 26:381–391.

Hsieh, S. P. Y. 2007. Bacterial leaf blight of rice. p.325–340. *in*: Plant Protection Illustrations 8: Rice Protection. Vol. 2. (Cheng, C. H., ed.) Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan. Taipei, Taiwan. 550 pp. (in Chinese)

Huang, C. Y., S. Y. Chou, Y. L. Lee, W. B. Tseng, C. W. Chen, C. S. Wang, and D. G. Lin. 2015. Transcriptomic analysis of a resistant mutant in response to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* infection. J. Taiwan Agric. Res. 64:145–158. (in Chinese with English abstact)

Huang, N., E. R. Angeles, J. Domingo, G. Magpantay, S. Singh, G. Zhang, N. Kumaravadivel, J. Bennett, and G. S. Khush. 1997. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: Marker assisted selection using RFLP and PCR. Theor. Appl. Genet. 95:313–320.

Iyer, A. S. and S. R. McCouch. 2004. The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. Mol. Plant Microbe Interact. 17:1348–1354.

Jansen, R. C. 2003. Studying complex biological systems using multifactorial perturbation. Nat. Rev. Genet. 4:145–151.

Jansen, R. C. and J. P. Nap. 2001. Genetical genomics: The added value from segregation. Trends Genet. 17:338–391.

Jiang, G. H., Z. H. Xia, Y. L. Zhou, J. Wan, D. Y. Li, R. S. Chen, W. X. Zhai, and L. H. Zhu. 2006. Testifying the rice bacterial blight resistance gene *xa5* by genetic complementation and further analyzing *xa5* (*Xa5*) in comparison with its homolog *TFIIAγ1*. Mol. Genet. Genomics 275:354–366.

Kauffman, H. E., A. P. K. Reddy, S. P. Y. Hsieh, and S. D. Merca. 1973. An improved technique for evaluation resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. Plant Dis. Rep. 57:537–541.

Khush, G. S., D. J. Mackill, and G. S. Sidhu. 1989. Breeding rice for resistance to bacterial blight. p.207–217. *in*: Bacterial Blight of Rice. (International Rice Research Institute, ed.) International Rice Research Institute. Manila, Philippines. 235 pp.

Kottapalli, K. R., N. Sarla, and S. Kikuchi. 2006. *In silico* insight into two rice chromosomal regions associated with submergence tolerance and resistance to bacterial leaf blight and gall midge. Biotechnol. Adv. 24:561–589.

Lin, X. H., D. P. Zhang, Y. F. Xie, H. P. Gao, and Q. Zhang. 1996. Identifying and mapping a new gene for bacterial blight resistance in rice based on RFLP markers. Phytopathology 86:1156–1159.

Lorenzo, O., R. Piqueras, J. J. Sánchez-Serrano, and R. Solano. 2003. Ethylene response factor 1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. Plant Cell 15:165–178.

Lyzenga, W. J., J. K. Booth, and S. L. Stone. 2012. The *Arabidopsis* RING-type E3 ligase *XBAT32* mediates the proteasomal degradation of the ethylene biosynthetic enzyme, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 7. Plant J. 71:23–34.

Mather, K. 1941. Variation and selection of polygenic characters. J. Genet. 41:159–193.

Mew, T. W., C. M. V. Cruz, and E. S. Medalla. 1992. Changes in race frequency of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in response to rice cultivars planted in the Philippines. Plant Dis. 76:1029–1032.

Niño-Liu, D. O., P. C. Ronald, and A. J. Bogdanove. 2006. *Xanthomonas oryzae* pathovars: Model pathogens of a model crop. Mol. Plant Pathol. 7:303–324.

Perálvarez-Marín, A., J. L. Bourdelande, E. Querol, and E. Padrós. 2006. The role of proline residues in the dynamics of transmembrane helices: The case of bacteriorhodopsin. Mol. Membr. Biol. 23:127–135.

Robert-Seilaniantz, A., D. MacLean, Y. Jikumaru, L. Hill, S. Yamaguchi, Y. Kamiya, and J. D. G. Jones. 2011. The microRNA miR393 re-directs secondary metabolite biosynthesis: Away from camalexin and towards glucosinolates. Plant J. 67:218–231.

Salvi, S. and R. Tuberosa. 2005. To clone or not to clone plant QTLs: Present and future challenges. Trends Plant Sci. 10:297–304.

Sama, V. S. A. K., N. Rawat, R. M. Sundaram, K. Himabindu, B. S. Naik, B. C. Viraktamath, and J. S. Bentur. 2014. A putative candidate for the recessive gall midge resistance gene *gm3* in rice identified and validated. Theor. Appl. Genet. 127:113–124.

Shanti, M. L., V. V. Shenoy, G. L. Devi, V. M. Kumar, P. Premalatha, G. N. Kumar, H. E. Shashidhar, U. B. Zehr, and W. H. Freeman. 2010. Marker-assisted breeding for resistance to bacterial leaf blight in popular cultivar and parental lines of hybrid rice. J. Plant Pathol. 92:495–501.

Shen, X., H. Liu, B. Yuan, X. Li, C. Xu, and S. Wang. 2011. OsEDR1 negatively regulates rice bacterial resistance via activation of ethylene biosynthesis. Plant Cell Environ. 34:179–191.

Song, W. Y., G. L. Wang, L. L. Chen, H. S. Kim, L. Y. Pi, T. Holsten, J. Gardner, B. Wang, W. X. Zhai, L. H. Zhu, C. Fauquet, and P. Ronald. 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. Science 270:1804–1806.

St. Clair, D. A. 2010. Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. Annu. Rev. Phytopathol. 48:247–268.

Sun, X., Y. Cao, Z. Yang, C. Xu, X. Li, S. Wang, and Q. Zhang. 2004. *Xa26*, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. Plant J. 37:517–527.

Tseng, H. Y., D. G. Lin, H. Y. Hsieh, Y. J. Tseng, W. B. Tseng, C. W. Chen, and C. S. Wang. 2015. Genetic analysis and molecular mapping of QTLs associated with resistance to bacterial blight in a rice mutant, SA0423. Euphytica 205:231–241.

Wang, C. S., A. Z. Wang, and D. G. Lin. 2013. The application of mutants in breeding disease resistance in rice. p.89–102. *in*: Special Issue or the Symposium on Important Crop Pathogen Detection and Management (Wang, C. L., F. J. Jan, and K. C. Zeng, eds.) Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan. Taichung, Taiwan. 193 pp. (in Chinese with English abstract)

Waterhouse, P. M. and C. A. Helliwell. 2003. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. Nat. Rev. Genet. 4:29–38.

Xiang, Y., Y. Cao, C. Xu, X. Li, and S. Wang. 2006. *Xa3*, conferring resistance for rice bacterial blight and encoding a receptor kinase-like protein, is the same as *Xa26*. Theor. Appl. Genet. 113:1347–1355.

Yang, D. L., Y. Yang, and Z. He. 2013. Roles of plant hormones and their interplay in rice immunity. Mol. Plant 6:675–685.

Yang, Z., X. Sun, S. Wang, and Q. Zhang. 2003. Genetic and physical mapping of a new gene for bacterial blight resistance in rice. Theor. Appl. Genet. 106:1467–1472.

Yoshimura, S., U. Yamanouchi, Y. Katayose, S. Toki, Z. X. Wang, I. Kono, N. Kurata, M. Yano, N. Iwata, and T. Sasaki. 1998. Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1663–1668.

Zhang, Q. 2007. Strategies for developing Green Super Rice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:16402–16409.

附錄 1. 即時定量 RT-PCR 引子之序列。

Appendix 1. Sequences of primer for real-time RT-PCR analysis.

Primer	Sequence (5’ → 3’)
Ankyrin F	TACGCATTCTTCCATCATCA
Ankyrin R	TTTCTCCACCCACATTCC
ACS1F	TTGGACACGCTGGATCTT
ACS1R	TATTGCTGTTCTTGCTGCT
ACS2F	AGAAGAACCCCCACGCGC
ACS2R	CACCTTGTACCCTCTCTG
ACS3F	ACTGTTGCTGGAGGTCAG
ACS3R	TCCTTGGTGAGCCTGAAG
Ubi-F1	ACACTTGTGATTCAGTTCCA
Ubi-R1	TGCAGTGTCGATGAAACC
oligo d (T) 18	GTTTTTTTTTTTTTTTTTT

附錄 2. 選殖 *Ankyrin* 基因之引子序列。

Appendix 2. Primers used for cloning of *Ankyrin* gene.

Primer	Sequence (5’ → 3’)
Ankyrin-F1	GTCGATGCCATTGAACAAGACA
Ankyrin-R1	GTAGGTCTGTCTAGCTTGCTG
Ankyrin-R1-1	GTATTTCTTAGTCCCTAGTGGAA
Ankyrin-F2	GCTCCTAATTGAGTCTGGTGTTG
Ankyrin-R2	GACTGTCCAGATTCATAGCACT
Ankyrin-R2-1	GTTCAGGGTTTGAGAATTTGCC
Ankyrin-F3	GATCTGCCTCCGGTTTACACT
Ankyrin-F3-1	GTGCGCGTGTCCCGTGTAAT
Ankyrin-F3-2	GAACGCCAGCTTGATCCCGA
Ankyrin-R3	GACTTAGCATTTGTTACCGGGA
Ankyrin-R3-1	GACTTTGCAGGTTGTAGACACT
Ankyrin-R3-2	GACCGTTTCCACCCGTTGTC
Ankyrin-CF4	GATGGGGCTCTTAGGTATGGTG
Ankyrin-CF4-1	GCTCTCCATTCTCGTTGCCT
Ankyrin-CR4	GCTATGAAAATTGTGAATATCTCCTAATT
Ankyrin-CR4-1	GACTACAGGTATGAAGAAGCCA

Study on the Resistance eQTLs in the Rice Bacterial Blight Resistant Mutant, SA0423

Da-Gin Lin[1], Yu-Ling Lin[2], Chiao-Yi Huang[3], Hsin-Yi Tseng[4], Wen-Bin Tseng[3], Chun-Wei Chen[5], and Chang-Sheng Wang[6,*]

Abstract

Lin, D. G., Y. L. Lin, C. Y. Huang, H. Y. Tseng, W. B. Tseng, C. W. Chen, and C. S. Wang. 2016. Study on the resistance eQTLs in the rice bacterial blight resistant mutant, SA0423. J. Taiwan Agric. Res. 65(1):54–69.

To explore the novel bacterial blight resistance gene for rice disease resistance breeding, 17 candidate resistance genes found from previous transcriptomic analysis were characterized in this study. The SSR markers flanking 5 cM region of them were retrieved from GRAME web site, and analyzed for the polymorphic markers between 'TN1' (susceptible parent) and SA0423 (resistant parent). Genotyping analysis of 177 'TN1' × SA0423 F_2 individuals was performed using polymorphic SSR markers. The lesion of these F_2 individuals were also investigated following the inoculation of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* XF89b (*Xoo* XF89b) as the resistance phenotype. The linkage between genotyping and resistance was analyzed by R/qtl using the single marker regression model. The result displayed that only RM6838 adjacent to *Ankyrin* showed a significantly high LOD (6.86) comparing with the threshold LOD (3.0). It is suggested that *Ankyrin* have high potential to be involved in providing the resistance of SA0423. The bioinformatic analysis demonstrates that the *Ankyrin* protein shares a similarity of 76% with the *Arabidopsis* RING type ligase, XBAT32, an *Arabidopsis* XB family. Results suggested that *Ankyrin* may change the ethylene biosynthesis pathway by regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (*ACS*), and then compromised the immune system. The real-time RT-PCR displayed that the expression profile of *Ankyrin* in SA0423 was less than that of 'TNG67'; however, higher expressions of *OsACS1* and *OsACS3* were found in SA0423. These findings indicated that the biosynthesis of ethylene might change in the SA0423 mutant leading to resistance against pathogens. Cloning and sequence comparison on *Ankyrin* gene found that 15 mutations were located in the coding region and resulted two amino acid mutations, Ser280Pro and Thr381Ala. Therefore, *Ankyrin* is considered to be one of the expression quantitative trait loci (eQTLs) involved in the bacterial blight resistance of SA0423.

Key words: Rice, Resistance of bacterial blight, Mutant, Transcriptome, Expression quantitative.

Received: May 12, 2015; Accepted: July 3, 2015.
* Corresponding author, e-mail: wangchansen@nchu.edu.tw
[1] Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Research Assistants, Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[5] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[6] Professor, Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 65(1):70–83 (2016)
DOI: 10.6156/JTAR/2016.06501.07 研究報告

研發成果之產出分析與加值應用：農業試驗所之案例

李宜映[1] 陳韋竣[2] 楊舜臣[3,*]

摘要

李宜映、陳韋竣、楊舜臣。2016。研發成果之產出分析與加值應用：農業試驗所之案例。台灣農業研究 65(1):70–83。

隨著國內外產業與社會經濟環境快速變遷，農業領域必須適時因應重大議題，發揮專業投入與整合能力，才能彰顯其科技研發之績效，相關農業科研機構應當具此宏遠認識。為期更系統化展現行政院農業委員會農業試驗所 (以下簡稱農試所) 之農業科研業務成果，彰顯對農業政策方向的配合與落實，以及帶動農業領域新興議題與實際解決重要產業問題的成效，本研究乃盤點農試所近 5 年之研究成果，並調查農試所研究成果所對應之受益對象、產出形式、發展階段和成果亮點等項目。除了整理為自評資料表單，亦進一步運用交叉分析呈現各研究對於農民、農企業、消費者與政府學研機構等不同目標對象所投入之程度，此分析結果將可運用於決策需優先協助或推動之研究業務，復可作為農試所創新推動議題之策略布局參考。另外，本研究以文字探勘方式，將研究業務進行分類並以檢索表形式呈現，期未來可利用於協助策略規劃人員瞭解農試所各研究單位所具備之研究內容與能力，運用於快速篩選適當研究人員投入所欲推動之議題，組成議題導向之跨領域研究團隊。綜合研究結果顯示，目前農試所主要之研發成果和研究人員集中之領域為栽培技術、育種和病蟲害防治技術等基礎研究，產出之主要受益者為農民。建議未來在因應社會經濟與自然環境變遷，以及配合農業政策與消費者需求下，可藉由基礎研究能量及跨領域整合方式來進行策略性前瞻布局，同時強化各研究單位之橫向整合，以更為精確地因應國家經濟建設和產業的發展需要，並充分呈展農試所之科研績效。

關鍵詞：農業議題、跨領域團隊、策略布局。

前言

行政院農業委員會農業試驗所 (以下簡稱農試所) 成立迄今已滿 120 年，係政府最主要的農業科研機關之一，專注於農業科技研究發展與產業推廣服務，對於我國農業發展與創新具有關鍵性的影響力。近年來環境、氣候與社會經濟快速變遷，農業發展的目標與需求也與時俱進調整，以因應衍生出的各式各樣產業議題 (Tzai 2006)。然而，當農業研究隨著大環境改變與調整期的同時，研究人員是否能夠順應大環境變化來彈性組成具有創新能力並解決問題的目標導向團隊，才是掌握重要議題及有效展現研發成果的根本所在 (Wang 2007)。因此，本文以農試所為研究案例，針對其目前的研發成果進行檢視且試以提供策略布局之規劃，包括建立資源投入與產出效益之展現等。首先經由研擬一套系統化效益盤點資料表單作為策略布局之架構與基礎 (Kuhlmann 2002)，以進行全面性研發成果檢視，並以引導研究人

投稿日期：2015 年 4 月 28 日；接受日期 : 2015 年 7 月 17 日。
* 通訊作者：yang@tari.gov.tw
1 台灣農業科技資源運籌管理學會研究員。台灣 台北市。
2 台灣農業科技資源運籌管理學會助理研究員。台灣 台北市。
3 行政院農業委員會農業試驗所所長室專門委員。台灣 台中市。

員加強橫向整合於科技計畫研提，強化目標需求導向之問題分析、邏輯架構與資訊整合等運籌管理能力 (Ratcliffe 2002)，最後得以彰顯機關整體科研績效。

綜此，本研究主要目的在於盤點與檢視農試所現有科技研發成果與科研投入成果，作為未來補強主題亮點技術缺口之建議，以利於朝向技術整合、產業化及技術輸出之目標前進。又建立檢索表與自評資料表單，用以瞭解農試所目前研發業務之概況和各研究人員所投入之專業領域，期以有助於其利用於調整農業科技研究之策略布局。

材料與方法

為了盤點農試所近 5 年研發成果，本研究設計農試所農業科研成果亮點自評表 (以下簡稱自評表)，並根據農業研究之特質，設計 6 大類問項，包含：(1) 技術 (服務) 推廣對象；(2) 技術 (服務) 的主要受益者；(3) 技術 (服務) 可產出之主要項目；(4) 技術 (服務) 特殊點；(5) 此技術 (服務) 現階段發展之情形；及 (6) 需協助項目。各問項皆設有選項，供研究人員依據其研發成果之特質勾選，並設有勾選其他與加註說明之欄位供研究人員詳盡填寫。每份自評表提供選填人員填寫一項近 5 年之研究成果，並且需述及研究成果施行技術與預期效益之量化指標。特於 2014 年 7 月 7 日舉辦農試所組織定位及研發策略發展研討說明會，邀請農試所各組室 54 位研究人員代表與會，研究人員代表為各組室主管研究計畫之人員，各組室至少有 1 名代表與會。於說明會向研究人員代表解說自評表之設計目的與填寫要點，自評表由各組室攜回，由實際執行研發業務之研究人員填寫，並於 2 wk 後進行自評表回收作業。經統整共累計 209 項研究成果自評表。

將回收之自評表所得之選填結果，以微軟 Excel 試算表彙整為自評資料表單 (圖 1A) 進行業務盤點，運用自評資料表單之篩選功能與人為判斷方式，交叉比對各業務之技術推廣者、受益者、主要產出、應用方式、成果亮點、發展階段、需協助項目與研究課題等項目，統計不同特質累計個數與占總數之百分比，比對出各項結果之業務數，以瞭解現階段農試所業務之主要目標對象、成果產出，以及可運用之方式。

另外，本研究以文字探勘 (text mining) 方法，即是將非結構化之文字，擷取並整合分析其規則、趨勢或模式之方法 (Wu 2002)，由農試所自評表各研究人員所填之研究內容中，擷取可辨識其主要研究目標之關鍵字，再將各研究內容之關鍵字，屬於研究目標為同一類型者歸為同一類，第一次分類後以第一關鍵字 (first keywords) 呈現各研究目標，因為以研究目標歸類後，各分項之研究數量仍多，因此再以研究所使用之技術或類型相似者進行第二次之歸類，歸類後以第二關鍵字 (second keywords) 呈現各類別 (表 1)，將各分類之最後數量控制在接近 10 項或以下，並將研究成果分類結果之個數分項加總，並整理為檢索表。由檢索表所整理之關鍵字分類，可快速搜尋農試所目前研發業務之分類方向，和位於該分類之研究業務數量，並檢索得知該分類之業務資訊、研究人員資訊和研究亮點特質等基本資料。

結果與討論

農試所研發技術推廣者與產出形式分析

為了瞭解現階段農試所累計之 209 項研發成果，後續可由農試所自行推廣，或者需轉由其他單位協助推廣，調查後顯示可由農試所自行推廣之研發成果有 160 項，占總體之 76.6%，另外 49 項研發可轉由其他單位協助或合作推廣 (表 2)。另調查了農試所 209 項研發成果可轉換之主要產出 (major output) 形式，例如育成品種品系 (cultivar)、栽培技術 (cultivation techniques)、檢驗技術 (inspection techniques)、病蟲害防治技術 (pest and disease control measures)、資材及設備 (materials and equipment)、資料庫 (database)、機能產品 (functional products)、採收後加工 (post-harvest processing) 和課程教材 (course materials)，並對應是否能由農試所自行推廣，以展現農試所之績效。單項研發成果可依照其研究方向轉換成 1 項以上之產出，經比對整理後

(A)

					VI.成果亮點											VII.成果發展階段		VIII.需
項次	研究室名稱	受訪者職稱	姓名	I.技術(服務)描述	1.具創新性 (A)	創新說明	2.解決社會重要問題(B)	解決說明	3.應用範圍廣(C)	應用說明	4.具經濟價值 (D)	價值說明	5.其他亮點	5-1.新品種	其他說明(E)	階段	補充說明	1.經費
1	植物營養	副研究員	張庚鵬	**西施柚健康管理生產體系之建立。** 本模式特色是針對土壤水分管理、土壤理化性質、氣候條件及不同生育期等因子酌予適當要素比率及養分量，並以低成本與高效率模式供應果樹吸收，即可得到高產且高品質的果實。	1	動態調整型水分與肥分管理	0	-	0	-	1	嘉義義竹地區西施柚園採動態調整型水分與肥分管理技術，年收益每年每公頃增加50~100萬元。	0	0	-	6	-	
2	作物蟲害管理研究室	副研究員	黃守宏	利用共食群之概念建立水稻飛蝨共同為害之防治基準，一次防治三種害蟲之為害，減少藥劑防治成本及次數，增加農民收益5%。	1	可同時針對多種水稻飛蝨進行共同防治，達到經濟防治之目的。	0	-	0	-	0	-	0	0	-	2	-	
3	作物蟲害管理研究室	副研究員	黃守宏	水稻飛蝨抗蟲性檢定，選育出抗蟲品種，減少農民施用藥劑次數，降低農民防治成本5-10%。	0	-	0	-	1	抗蟲品種之應用，為有機栽培蟲害管理之基礎。	0	-	0	0	-	5	-	
4	作物蟲害管理研究室	副研究員	黃守宏	瞭解鳳梨嫡粉介殼蟲之分布情形，並達到有效防治之目的，降低農民防治成本5%。	0	-	1	提出防治方法，降低農民損失	0	-	0	-	0	0	-	3	-	
5	作物蟲害管理研究室	副研究員	黃守宏	水稻害蟲長期監測，提供害蟲發生預警制度之建立，可減少害蟲可能造成之為害損失5%。	0	-	1	提出害蟲監測及建立預警制度，降低農民損失	0	-	0	-	0	0	-	3	-	
6	植物保護系作物蟲害實驗室	助理研究員	王泰權	荔枝癭蠅之發生監測與防治-荔枝癭蠅為近年來入侵之外害荔枝之重要害蟲，本研究則以癭蠅之分類鑑定、入侵生態及篩選防治藥劑，以供農民應用及防治此害蟲。	0	-	1	荔枝癭蠅為重要入侵害蟲，了解其生態及篩選防治藥劑，可減少農民的損失。	0	-	0	-	0	0	-	2	-	
7	植物保護系作物蟲害實驗室	助理研究員	王泰權	植物菌植體病害及媒介昆蟲傳播研究-植物菌植體造成果樹之系統性病徵，通常由昆蟲進行傳播；本技術為發展病原之鑑定技術與媒介昆蟲傳播研究，以利田間對於本病害與媒介昆蟲的防治。	0	-	1	研究危害果樹之植物菌植體，發展病原之鑑定方式與蟲媒傳播研究，可幫助農民防治植物菌植體之病害。	0	-	0	-	0	0	-	1	-	0
[illegible]	植物保護系 [illegible]	[illegible]	[illegible]	果實蠅誘殺技術之開發與應用-本技術為利用不同的防治誘殺技術進行果實 [illegible]	[illegible]		[illegible]	發展多種對於果實蠅之誘發防治方式，並建立一套可供 [illegible]	[illegible]		[illegible]		[illegible]	[illegible]		[illegible]		[illegible]

(B)

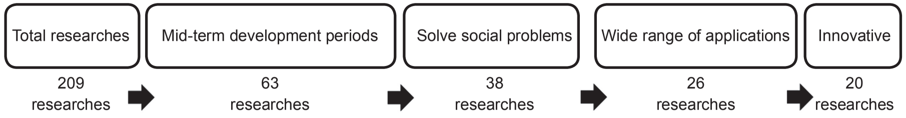


圖 1.　農業試驗所研發成果自評資料表單圖例 (A) 與運用自評資料表單篩選優先推動議題之示意圖 (B)。

Fig. 1.　Diagram of the database of Taiwan Agricultural Research Institute's scientific and technological achievements (A) and an example of the selection to identify priority issues (B).

表 1.　農試所研發成果檢索表。

Table 1.　Index of Taiwan Agricultural Research Institute's research achievements.

Symbol 1	First keyword[z]	Symbol 2	Second keyword[y]	Quantity of research[x]
A	Health management culturing systems	1	Facilities management	6
		2	Disease management	9
		3	Nutrition management	5
		4	Production management of tissueculture	4
		5	Reducing chemicals and toxic agents	6
		6	Cultivation management	6
B	Pest and disease prevention	7	Prevention by plant extracts	3
		8	Beneficial biocontrol	6
		9	Prevention by inducing agents	7
		10	Physically control	3
		11	Pest ecological monitoring (and control)	8
		12	Disease identification	6
		13	Standard operating procedures of disease verification	4
		14	Disease physiology	2
		15	Virus screening techniques	5
C	Cultivar breeding	16	Disease resistance breeding	6
		17	Stress resistance breeding	3
		18	Improve functional ingredients	5
		19	Increase export potential	5
		20	Breeding for suitable areas	14
		21	Novelty breeding (didn't show exact orientation)	10
D	Agronomy quality enhance techniques	22	Agricultural facilities	5
		23	Processing techniques	4
		24	Postharvest treatment techniques	7
		25	Cultivation and production techniques	3
		26	Agricultural machinery	3
		27	Mushroom production techniques	2
E	Various types of database	28	Soil and water resource database	4
		29	Agricultural climate and cultivation information platform	9
		30	Breeding resource databases	9
		31	Crop physiology databases	7
		32	Disease resistance resource databases	7
F	Reduce environmental pollution	33	Monitoring of heavy metals	5
		34	Detection of chemicals and toxic agents	2
		35	Agricultural residues recycling	4
G	Develop functional products	36	Herbal medicine use	2
		37	Food use	3
		38	Care and cosmetics use	4
H	Agricultural extension counseling	39	Development of agricultural talents	4
		40	Agricultural production and marketing plan	2

[z] First keywords indicates the topics sorted by the main purpose of researches.
[y] Second keywords indicates the topics sorted by the methods or fields of researches.
[x] Indicates quantities.

表 2. 農試所研發成果之推廣者與產出形式分布情形。

Table 2. Distribution of the major outputs of Taiwan Agricultural Research Institute and their technology promoters.

	Technology promoter			
	TARI		other than TARI	
Major output	No. of researches	Proportion (%)[z]	No. of researches	Proportion (%)[y]
Cultivar	45	28.1	11	22.4
Cultivation techniques	57	35.6	9	18.4
Inspection techniques	32	20.0	11	22.4
Pest and disease control measures	37	23.1	22	44.9
Materials and equipment	10	6.3	1	2.0
Database	32	20.0	5	10.2
Functional products	4	2.5	4	8.2
Postharvest processing	5	3.1	4	8.2
Course materials	2	1.3	1	2.0

[z] Proportions were calculated from the number of researches promoted by TARI (160) over the number of major outputs.
[y] Proportions were calculated from the number of researches not promoted by TARI (49) over the number of major outputs.

於表 2，呈現農試所的研發成果之推廣者與產出項目分布情形。由農試所自行推廣之 160 項研發成果，其主要產出形式，以栽培技術之比例最高，占 35.6% (57/160 = 35.6%)，其次為育成品種品系，占 28.1% (45/160 = 28.1%)，顯示作物栽培技術與品種品系之育成，目前仍為農試所研發成果之重點。

此外，研究結果亦顯示，非由農試所推廣之 49 項研發成果，產出方式所占比例最高之項目為病蟲害防治技術，占 44.9% (22/49 = 44.9%)，其中包含各種作物病害之控制及防治方法等。推測農試所以外之農業單位，在防治技術推廣之需求較高，且符合實際農業生產時，多優先考慮研發病蟲害防治技術，以有助於降低生產耗損之考量。另外，在農試所推廣的研發成果項目以品種品系、栽培技術和病蟲害防治技術為最高之前 3 項；其次為檢驗技術 (inspection techniques) 和資料庫 (database)；資材機具 (materials and equipment)、機能性產品 (functional products)、採收後處理加工 (postharvest processing) 和課程教材 (course materials) 等項目，目前研發投入之數量相對較少。

農試所研發成果產出形式與受益者分析

依據農試所之組織功能與定位，本研究將農試所研發成果之受益者整併為 4 大類型，分別為農民與農民組織 (包含農民、農會和產銷班)、農企業、消費者，以及政府學研機構 (包含農試所、改良場、學研機構與其他政府單位)，單項研發成果之受益者可為一類型以上，例如育種相關之研發成果，受益者可能有農民與農民組織、消費者和農企業。依調查統計資料顯示，目前農試所研發成果各類受益者數量除以研發成果數量 (209 項) 之占比，比例最高者為農民與農民組織，占 88.5%；農企業次之，占 51.7%，第 3 為政府學研機構，占 47.8%；受益者為消費者所占比例最少，占 37.8% (表 3)。

進一步分析農試所研發成果之主要產出形式數量，應用於不同類型受益者之分布情形 (表 4)，並以百分率顯示不同受益者可受惠之產出形式與所有產出形式之比例，由此可瞭解發展何種產出形式對何類受益者之效益最高。在此調查中，發展課程教材對農民與農民組織之受益效益最高 (100.0%)，發展機能性產品對農企業之受益效益最高 (100.0%)。而主要產出形式總數較多之 5 項，分別為品種品系 (56 項)、栽培技術 (66 項)、檢驗技術 (43 項)、病蟲害防治技術 (59 項) 和資料庫 (37 項)，應為農試所目前研究發展之主要方向。分析其產出效益可能會有需求缺口之原因，若受益者為農

表 3. 農試所研發成果之受益者分布情形。

Table 3. Technique beneficiaries and distribution of Taiwan Agricultural Research Institute's research achievements.

Technique beneficiary	No. of researches	Proportion (%)[z]
Farmers and farmers' organizations	185	88.5
Agribusiness	108	51.7
Consumers	79	37.8
Government and research institutions	100	47.8

[z] Proportions were calculated from the number of researches of Taiwan Agricultural Research Institute (209) over the number of technique beneficiaries.

表 4. 農試所研發成果供不同受益者使用之主要產出形式。

Table 4. Beneficiaries and the distribution of the production forms from Taiwan Agricultural Research Institute's research achievements.

	Farmer (185)[z]		Agribusiness (108)		Consumer (79)		Institution (100)		Total (209)	
Major output	No.[y]	Proportion (%)	No.	Proportion (%)	No.	Proportion (%)	No.	Proportion (%)	Qty	Proportion (%)
Cultivar	52	92.9	32	57.1	35	62.5	17	30.4	56	100.0
Cultivation techniques	60	90.9	42	63.6	23	34.8	21	31.8	66	100.0
Inspection techniques	32	74.4	19	44.2	15	34.9	23	53.5	43	100.0
Pest and disease control measures	57	96.6	27	45.8	19	32.2	26	44.1	59	100.0
Materials and equipment	8	72.7	9	81.8	2	18.2	7	63.6	11	100.0
Database	30	81.1	18	48.6	15	40.5	24	64.9	37	100.0
Functional products	6	75.0	8	100.0	6	75.0	2	25.0	8	100.0
Postharvest processing	8	88.9	7	77.8	5	55.6	1	11.1	9	100.0
Course materials	3	100.0	2	66.7	0	0.0	1	33.3	3	100.0

[z] Numbers in the brackets indicate numbers of research achievements that have been surveyed per each Target audiences.
[y] Indicate numbers of research achievements.

民，排序在前 5 項主要之產出形式中，檢驗技術之比例較其他產出形式低 (74.4%)，推測因檢驗技術多需投資高技術與經費層面之資源或設備，因此未來或可增加與農企業 (44.2%) 及政府學研機構 (53.5%) 合作之機會，以補強其技術和資源之需求。

若受益者為農企業，主要產出形式則以機能性產品所占比例最高，為 100.0%；舉例其研發方向如萃取農作物之機能成分，以製成皮膚修復精華油、生髮油、防治害蟲用大豆油乳液等產品。主要產出形式為資材機具者占 81.8%，其研發方向如環控設施電能量測組件、植物工廠自動化作業裝置、根莖類作物收穫機與自走式土壤蒸氣處理機。主要產出形式為栽培技術者占 63.6%，包含建立各種適合大規模設施生產之作物之健康生產栽培體系，以減少生產損耗並提高經濟價值。前述為應用於農企業受益者所占比例最高之前 3 類產出形式，未來可進一步針對農企業需求進行重點式發展，以大幅提升農產品加工與農機領域之研發效益。

受益者為消費者之產出形式，以機能性產

品 (75.5%) 與品種品系 (62.5%) 比例較高，此類研發成果提供消費者具機能性、較現有品種更具價值之新產品。由於農政單位以對消費者之貢獻程度為績效評估之重要指標，積極投入此研究領域可強化消費者對農試所研發成果於前述兩項成果之印象與正向觀感。而進一步加強其餘產出形式對消費者之使用效益，可使農試所研發成果能更直接應用於廣大的消費者族群。

受益者為政府學研機構之產出形式，則以資料庫 (64.9%) 和檢驗技術 (53.5%) 比例較高。研究推測此類研發成果因需較多設備和人力維持穩定之運作，雖可保障產業發展，其實際應用效益卻難以量化，且需投入較多的人力和資源。如農田土地覆蓋資料庫之建置，對於產業需求導向的相關的趨勢分析與決策評估提供了許多重要的背景資訊，為農業施政決策、農業生產、水資源調度及農業災損估算之參考。糧食生產評估系統之建置，可評估不同農業政策調整下之水稻生產力，作為因應氣候變遷及農田活化等政策之依據。另外，作物種原資料庫、溫室氣體和地下水等資料庫，皆提供農試所未來針對氣候環境變遷，或者社會環境、消費需求等改變之重要基礎資訊，對未來相關因應策略發展十分有助益，乃需要持續投入資源之發展項目。由此可見，未來或可進一步規劃如何活化資料庫資訊，以應用於新議題，或將資料庫資源以學研機構為平台，擴展至農民、農企業與消費者等其他受益對象，將資源共享並作最有效之運用以達到最佳效能。

農試所研發成果主要應用方式與成果預期效益分析

根據自評表問卷調查資料由研究人員自評結果 (表 5)，分析農試所研發成果受益者與主要應用方式 (major application) 之關聯。單項主要應用方式可由複數以上之受益者使用時，結果顯示受益者為農民時，研發成果主要之應用方式以透過申請品種權 (variety right application) 所占比例最高，為 97.5%。申請專利 (patents)、技術轉移 (technology transfer) 與諮詢輔導 (consulting and guidance) 皆在 9 成左右，有 76.3% 係透過著作發表。受益者為農企業時，研發成果主要之應用方式以申請專利與技術轉移所占比例較高；消費者在此處之受益方式應以間接受益為主。政府學研機構受益方式，則以著作發表與技術諮詢輔導之比例較高 (表 5)。

在進行農試所成果效益評估時，可先針對研發成果欲應用之主要受益者，先行瞭解其需求後，建立改善或解決現況之目標與其效益指標，有助於擬訂策略與執行方法，更符合受益對象之需求 (Chinman *et al*. 2004)。對於科技研發成果之預期效益，本研究依農民、農企業、消費者與政府學研機構四類受益者，根據其不同需求特性建立不同面向之評估指標，並將目前農試所研究業務符合各項評估指標之數量進行統計 (表 6)。本研究結果顯示，以農民為目標受益者時，以達到提升收益或降低損

表 5. 農試所研發成果供受益者使用之主要應用方式。

Table 5. The main applications and the beneficiaries of the Taiwan Agricultural Research Institute's research achievements.

	Farmer (185)[z]		Agribusiness (108)		Consumer (79)		Institution (100)		Total (209)	
Major application	No.[y]	Proportion (%)	No.	Proportion (%)	No.	Proportion (%)	No.	Proportion (%)	No.	Proportion (%)
Variety right application	39	97.5%	22	55.0	24	60.0%	12	30.0	40	100.0
Patents	19	90.5%	15	71.4	10	47.6%	8	38.1	21	100.0
Technology transfer	93	89.4%	68	65.4	44	42.3%	35	33.7	104	100.0
Publications	58	76.3%	40	52.6	22	28.9%	40	52.6	76	100.0
Consulting and guidance	98	91.6%	57	53.3	39	36.4%	46	43.0	107	100.0

[z] Numbers in the brackets indicate numbers of research achievements that have been surveyed per each Target audiences.

[y] Indicates numbers of research achievements.

表 **6.** 農試所科技研發成果之預期效益分布情形。

Table 6. The distribution of expected benefits on Taiwan Agricultural Research Institute's research achievements.

Technique beneficiary	Benefit/outcome of research	Number of research achievements	Execution method
Farmers	1. Raise of revenue or reduction of losses	99	1. Improvement of research methods 2. Interdisciplinary innovation and integration 3. Promotion or transfer of innovative technologies 4. Description of theories 5. Improvementof workflow
	2. Reduction of the environmental impact due to agricultural operations	8	
	3. More convenient to operate agribusiness	9	
Agribusiness	1. Assurance of product quality and increase of output value	34	
	2. Enhancement of industrial research and development efficiency and labor saving	10	
	3. Innovation of technologies and products.	22	
Consumers	1. Improvement of Consumers' food safety	13	
	2. Enhancement of consumers' livelihood	6	
	3. Increasing the diversity of choices for consumers	25	
	4. Provision of agricultural knowledge platform	1	
Institutions	1. Development of teaching materials and tools	1	
	2. Strategic basic researches	5	
	3. Training of talents	1	
	4. Application of database analysis and development of interpretation methods	4	

耗、降低農事作業對環境之影響及提升農事作業之便利等 3 項可作為其效益指標。經檢視目前農試所研究業務，有 99 項研發符合提升收益或降低損耗，顯示目前規劃研究計畫時多以此面向為重點，相對於降低環境影響與提升農事作業效率等面向，分別僅 8 項與 9 項研究。

以農企業為受益對象時，兼顧注重生產成本與維持品質者，為企業體所重視項目，因此建議可以確保產品品質以提高產值、使人力維持最佳效能以提升作業效率及增加產品產出等 3 項作為科研成果之效益指標 (Chell & Allman 2003)。經盤點檢視目前農試所研發成果項目，有 34 項為確保產品品質以提高產值之效益目標。對於使人力維持最佳效能，提升作業效率、增加產品產出之面向，提升產業研發效率並節省人力為效益指標，目前則有 10 項符合。持續開發新產品、保持與市場需求趨勢之互動，目前研發成果項目中有 22 項符合。針對農企業所需，有必要對於各個面向建立效益指標，使農試所研究發展方向更具全面性。因此以目前研發分析，未來或可朝加強農企業作業效率面向，進行研發成果應用。

以消費者為受益對象時，保障消費者食的安全、提升生活品質、提升消費者多樣化選擇及提供農學知識庫平台等 4 項可作為其效益指標。目前農試所研發成果項目，有 13 項符合保障消費者食的安全之效益指標，有 6 項研發成果符合提升生活品質面向，有 25 項符合提升消費者多樣化選擇面向。由分析結果顯示，產期調節、環境適應力更佳、符合消費者喜好之作物品種，為目前農試所之發展重點。然而建立農學知識庫平台推廣給消費者，以提升消費者對農業關注度與瞭解程度之面向，目前農試所相對應可符合之研發成果較少，未來可朝此進一步規劃發展。

以政府學研機構為受益對象時，因目前農試所研發成果大部分皆集中於提供農民、農企業與消費者之策略性研究，僅少量策略性基礎研究與資料庫應用可與政府學研機構合作運用，在研發供政府學研機構使用之教具教材與人才培育之效益開發方面較無積極投入。建議未來農試所可強化與其他農政單位和學研

單位協同合作，透過農試所以人才培育或教材開發形式，將基礎研究轉化為更符合可供產業與社會經濟運用之策略性研究 (Liu & Hsieh 2006)，使台灣之農業議題研究於各機關單位間能更適宜且有效率地分工與合作。

農試所研發成果發展階段與研究課題之分析

本研究將農業研究產業應用模式由基礎研究至產業推廣階段，區分為 6 個發展階段 (development stages)，並交由農試所研究人員進行自評其各項研究業務位於何階段。6 個發展階段之選項敘述分別為：第 1 階段-文獻資料整備階段並進行基礎研究 (發現問題與釐清問題)；第 2 階段-學理可行性驗證 (應用技術/服務的開發與測試)；第 3 階段-實際應用試測 (技術/服務應用的效果評估)；第 4 階段-商品或技術 (服務) 形成雛型 (技術/服務整合及可行性分析)；第 5 階段-商品或技術 (服務) 完成 (技術/服務成熟)；及第 6 階段-進行量產、技術轉移或推廣服務 (技術/服務進行效益評估)。

整理結果顯示 (表 7)，目前農試所之研發業務有 32.5% 位於第 6 階段之占比最高，可進行效益評估篩選出適當之業務，積極投入展現成果以應用之布局。位於第 5 階段之研發業務占 17.7%，可規劃資源補足需求缺口，做為下一階段可進行推廣之重點項目。而位於第 3 階段，即研發成果達實際應用試測之階段占比亦有 22.0%，此階段為科學基礎研究已有成果，需進一步朝商品化或產業化方向進展，決策者可對此階段之研究進行評估，根據農試所發展策略加強協助具有產業化潛力之研究，或是由中發掘新興議題，將是未來農試所持續進步之基礎。另外，將 6 個發展階段整併為 3 個發展期 (development periods) 進一步分析，發展初期 (early) 為第 1 階段與第 2 階段，發展中期 (mid-term) 為第 3 階段與第 4 階段，發展成熟期 (maturity) 為第 5 階段與第 6 階段，研究結果顯示近 5 成的研發成果已屬發展成熟期，30% 研發成果屬於發展中階段，20% 的研發成果屬於初期階段 (表 7)。

為了由 209 項研發成果中檢視農試所科研成果之發展重點，以文字探勘 (text mining) 方式將所有研發業務重新分類為 A–H 等 8 項研究課題，以代表根據目前農試所之研發項目統整分類後呈現之領域分布。8 項研究課題分別為健康管理生產體系 (A, health management cultivation systems)、病蟲害防治 (B, pest and disease control measures)、新品種品系育種 (C, cultivar breeding programs)、提升農業品質之技術 (D, agronomic quality enhancement techniques)、各式資料庫 (E, various types of databases)、降低環境和汙染危害 (F, reducing environmental pollution)、機能產品開發 (G, developing functional products)、農業推廣輔導 (H, agricultural extension services)。本研究整併各研究課題之研發數量後，再與 3 個發展期與不同社會經濟效應特質進行交叉分析，以探討農試所研發成果符合不同社會經濟效應特質之數量與分布情形 (表 8 及表 9)。由結果顯示，農試所研發業務最多的研究課題為病蟲害防治，總共有 44 項；其次為新品種品系，有 43 項；接著為健康管理生產體系與各式資料庫，分別有 36 項；提升農業品質之技術 (包

表 7. 農試所研發成果發展階段之分布情形。

Table 7. Distribution on development periods and development stages of Taiwan Agricultural Research Institute's research achievements.

Development period	Development stage	Number of research achievements	Proportion (%)
Early	1st stage	15	7.2
	2nd stage	26	12.4
Mid-term	3rd stage	46	22.0
	4th stage	17	8.1
Maturity	5th stage	37	17.7
	6th stage	68	32.5

表 8. 農試所研發成果於發展階段與研究課題之研發業務數量與比例。

Table 8. The quantity and ratio on development periods and research topics of Taiwan Agricultural Research Institute's research achievements.

	A	B	C	D	E	F	G	H
Development period	Health management cultivation system	Pests and diseases control measure	Cultivar breeding program	Agronomic quality enhancement technique	Various types of database	Reducing environmental pollution	Developing functional product	Agricultural extension service
Early (41)[z]	5[y] (13.9%)[x]	14 (31.8%)	2 (4.7%)	3 (12.5%)	15 (41.7%)	1 (9.1%)	1 (11.1%)	0 (0.0%)
Mid-term (63)	13 (36.1%)	12 (27.3%)	6 (14.0%)	11 (45.8%)	7 (19.4%)	7 (63.6%)	5 (55.6%)	2 (33.3%)
Maturity (105)	18 (50.0%)	18 (40.9%)	35 (81.4%)	10 (41.7%)	14 (38.9%)	3 (27.3%)	3 (33.3%)	4 (66.7%)
Total (209)	36 (100.0%)	44 (100.0%)	43 (100.0%)	24 (100.0%)	36 (100.0%)	11 (100.0%)	9 (100.0%)	6 (100.0%)

[z] Numbers in the brackets indicate quantities of research that have been surveyed in each development periods.
[y] Numbers indicate quantities of research.
[x] Numbers in the brackets indicate proportion of research topics in each development periods.

表 **9.** 農試所研發成果於研究課題、研究發展期與社會經濟特質之研發業務數量。

Table 9. The numbers of the major research topics, the development periods and the socio-economic characteristic-sclassified from Taiwan Agricultural Research Institute’s research achievements.

Development period	Socio-economic characteristics	A (36)[z]	B (44)	C (43)	D (24)	E (36)	F (11)	G (9)	H (6)	Total (209)
Early (41)[y]	1. Innovation	4	3	1	2	7	1	1	0	19
	2. Solving social problems	3	10	2	1	7	1	1	0	25
	3. Wide range of applications	1	5	0	2	8	0	1	0	17
	4. More economical value	4	6	1	2	6	0	0	0	19
Mid-term (63)	1. Innovation	3	6	4	7	6	6	5	1	38
	2. Solving social problems	8	8	2	5	5	7	3	0	38
	3. Wide range of applications	5	5	2	6	5	3	3	1	30
	4. More economical value	11	6	5	5	4	3	3	0	37
Maturity (105)	1. Innovation	8	12	25	8	9	3	3	2	70
	2. Solving social problems	10	15	20	4	5	2	2	3	61
	3. Wide range of applications	8	17	17	7	8	2	2	2	63
	4. More economical value	15	10	29	7	6	3	3	3	76

[z] Numbers in the brackets indicate quantities of research in that topic. A: Health management cultivation systems; B: Pests and diseasescontrol measures; C: Cultivar breeding programs; D: Agronomic quality enhancement techniques; E: Various types of databases; F: Reducing environmental pollution; G: Developing functional products; and H: Agricultural extension services.

[y] Numbers in the brackets indicate quantities of research that have been surveyed in each development periods.

含加工、處理、農機、資材領域) 有 24 項。降低環境和汙染危害、機能產品開發、農業推廣輔導所占比例較少。

各研究課題與發展階段交叉分析顯示，健康生產管理體系目前有 50.0% 達發展成熟期，其餘仍在發展初期與中期。病蟲害防治領域研發數量最多，約有 4 成 (40.9%) 達發展成熟期，約 3 成位於發展初期 (31.8%) 和發展中期 (27.3%)。新品種品系育種領域高達 8 成已達發展成熟期，其餘仍在發展中期和初期之研發僅 8 項，可見此課題為農試所科研成果豐碩且研發能力成熟之領域，未來或可優先強化此領域之產業化發展，推展研發成果亮點，使農民、農企業和消費者等對象能充分受益。提升農業品質之技術領域約有 4 成處於發展中期 (45.8%) 和發展成熟期 (41.7%)，建議評估具產業化潛力者投入資源，使此領域之發展更成熟；各式資料庫方面，約有 4 成位於發展初期 (41.7%) 和發展成熟期 (38.9%)，因資料庫之建立，需投資大量調查、操作人力和資金，因此建議需審慎評估和規劃所需投資於發展初期階段之資料庫相關研發。對於已發展成熟之資料庫，需規劃如何充分活化以達到對農民、農企業、消費者與政府學研機構等受益者最高之應用效益。降低環境和汙染危害、機能產品開發與農業推廣輔導等研究領域，為農業永續發展價值鏈之重要趨勢，但由研究結果顯示目前農試所投入前述課題之研發相對較少，未來建議可加強此課題之研究發展。

本研究另分析農試所研發成果對社會經濟之效益，根據研究人員自評其業務是否具有創新性 (innovation)、可解決社會問題 (solving social problems)、應用範圍廣 (wide range of applications)，以及具有經濟價值 (more economical value) 等亮點特質進行勾選，單項研究成果可有複數以上之社會經濟效益。由表 8 統計結果顯示，位於發展成熟期之研發成果，具經濟價值之比例達 7 成 (76/105 = 72.4%)，其中以「育成新品種系」(見表 8 之 C 欄位，有 29 項) 之課題研發數量最高。另外，「育成新品種系」位於發展成熟期之研發成果，其具有社會經濟效益之研發成果數量，與不同研究課題比較時皆是最多的；例如具創新性有 25 項、可解決社會問題有 20 項、應用範圍廣有 17 項。

可見農試所研發之新品種品系，具有高經濟價值、具創新性、可解決社會問題等多項特質，充分具有因應產業環境與民眾互動之潛力。另外研究結果顯示，占第 2 位者為位於成熟期、且具社會經濟效應特質之病蟲害防治課題 (見 B 欄位)，有 17 項具應用性廣之特質，對於台灣常見而重要之作物病害提供病原釐清和檢測等技術，並開發符合環保需求、減少農藥使用之防治方法，以生產健康安全之經濟作物，於民眾對安全農產品日益提升之期待極具發展潛力。具多項社會經濟效益特質且位於成熟期之業務，研發成果數量位於第 3 之研究課題為健康管理生產體系 (見 A 欄位)，結合作物栽培技術、防治技術、設施農業等各式綜合生產管理技術，生產安全健康無汙染之作物，未來如何提升健康生產管理體系與社會經濟效益之互動，使之更具產業應用價值，建議可規劃進行適度的資源分配，為進一步發展之方向。未來對於發展成熟期之研發，可依據其研究課題規劃對受益者或社會經濟更密切與良好之連結，或研提產研科技專案計畫，促使研發成果之技術與產品商品化，以加速農業科技之產業化及提升農業產業競爭力。

研發成果自評資料表單進階應用於篩選優先推動議題與組成研發團隊

由農試所研究人員所自評之 209 項研究業務所整理之自評資料表單，可協助決策者或策略規劃人員進行策略布局時之參考資訊基礎，並彙整出可作為優先推動議題之研發成果。或根據新議題所需之特質，設定篩選項目，整理出符合特質之研發業務，以協助策略規劃者進行決策布局與規劃資源投入之優先順序。此外，可進一步瞭解此研發業務之基本資料，例如研究人員姓名、研究內容和效益說明和需求等項目，作為研提新計畫之考量 (圖 1A)。舉例運用研發成果自評資料表單之篩選功能之方法，如 209 項研究業務篩選後，位於發展中期、可解決社會問題、具創新性和應用範圍廣之研究業務有 20 項 (圖 1B)，策略規劃者經由檢視此 20 項研究業務，可瞭解目前研究人員投入研究之方向與發展階段，適時給予建議或協助，提高後續研究之效率；而已具充分應用價值之研究成果，則可做為推廣和成果展現之案例。

為了能由自評資料表單篩選跨領域導向之研究團隊，將農試所研發業務之 A–H 研究課題再根據其研究所運用的方法領域進行次分類，以檢索表方式呈現，使 209 項研發業務都能在檢索表中對應 (表 1)。如此可依據新議題內容或欲組成之跨領域團隊研發任務內容 (或內涵) 檢索到相對應的研究室和研究人員，藉以找到符合新議題所需，且具有該領域充分研發能力之適當團隊人選。

舉例而言，如參考經濟發展諮詢委員會議農業議題共同意見所提到的農業議題：發展生物技術、自動化與環控等重點高科技，以促進農漁畜產業升級 (http://www.coa.gov.tw/view.php?catid=3838)，可由檢索表中選擇相關的分類，如 A-1、D-22、D-26 與自動化和環控相關；B-15 與生物技術相關；H-40 與農業產業升級相關。檢索後可對應出位於該分類項目之研發業務與目前進行相關之研究人員為何，由此選定適當參與新議題討論之研究員人選，並組成議題導向之跨領域研究團隊。此方法可協助決策者檢視研究人員的研究面向和擅長的領域，並依據議題之大小，適時調整參與研討之人數，以供決策者進行策略規劃時之參考。

結論

本研究顯示農試所科研成果目前以栽培技術、育成新品種品系與病蟲害防治技術為最主要之產出，受益者以農民為主，農企業次之。成果中以健康管理生產體系、作物病蟲防治與育成新品種品系最為豐碩，且發展階段多數位居成熟期，可作為優先推動議題首要考量之領域。面對產業環境改變與消費民眾對農政單位之期待日益增加，加強符合消費者需求與可解決重要社會問題，並貼近民眾日常生活所重視之研究，為展現農政單位績效之重點方向。換言之，如何以先進之農業科技，解決人民所關心之議題，並能與國際接軌，乃為農試所可積極投入之方向 (Tzai 2006)。

針對未來農試所之研究方向，可依不同受

益對象而有不同之目標設定。例如，對農民與組織而言，可整合優良育種資源、改良栽培或防治等技術，使農事工作者能更省時省力耕作，擁有高品質且小康之生活，且以低環境汙染之工作模式使台灣土地永續經營。對於農企業，可透過新產品或新技術的改良與開發，建構完善產業鏈，又可經由產學合作方式提高農企業的獲益成長與產品產能，提升農企業的運作效率並節省人力成本。對於消費者，提高消費者對農產品安全且安心之信心，提前因應高齡化社會所需之養生、健康與高營養價值之多功能農產品，維持民眾良好的生活品質。至於對政府學研機構，當加強學研合作機會，培育專業領域與跨領域整合能力兼具之實務應用型研究人員。另可積極將研究成果建構為資料庫，並以策略規劃工具進行跨領域資源整合、活化和應用資料庫，作為重大議題研討和決策之重要依據。以上若能透過研發成果對應於不同受益對象目標之建立，將有利於突顯研發成果之效益價值。

有鑑於農產業因社會經濟條件快速變遷，農業轉型腳步刻不容緩，近年農業相關之重要議題多需跨領域整合，農業不同領域之專業研究成果，需共同研討與互補，以因應面向廣且複雜之議題。目前農試所之研究單位組成方式主要為技術導向，因此累積許多專業且深入之研究資源，未來可積極將研究資源，透過橫向整合並轉譯為知識庫，使各領域之研究單位能有效率地運用和熟悉跨領域之研究資源，增進研究之廣度與深度，且能更有彈性地發現問題和解決問題 (Wang 2008)。

研發成果自評資料表單之建構，有助於定期掌握所內研發成果與發展方向與需求，另可顯示資源重複投入之處，作為隨時調整研究策略方針之參據。本研究以文字探勘方式將研發成果以目標導向之分類架構重新整併，不但可有效率地篩選和組成議題導向之科研計畫團隊，也有助於管理決策者掌握研發進行布局。未來或可針對政策性方針，如因應氣候變遷、確保糧食安全、健康管理體系整廠輸出等方向，依此組成農試所內部跨單位之研究團隊，加強研究人員領域間之橫向整合與交流，使科研計畫目標能有周全之考量並有效率地確切解決問題。

誌謝

本研究承 2014 年農業試驗所研發能量研析與策略布局研究計畫經費補助，特此感謝農業試驗所研究人員填寫自評表以建構自評資料表單，以及農業試驗所單位主管與研究主持人提供資源及分析建議，僅此一併誌謝。

引用文獻

Chell, E. and K. Allman. 2003. Mapping the motivations and intentions of technology orientated entrepreneurs. Res. Develop. Manage. 33:117–134.

Chinman, M., P. Imm, and A. Wandersman. 2004. Getting to Outcomes™ 2004: Promoting Accountability Through Methods and Tools for Planning, Implementation, and Evaluation. Rand Tech. Rpt. Santa Monica. 219 pp.

Kuhlmann, S. 2002. Foresight and technology assessment as complementing evaluation tools. p.192–199. *in*: RTD Evaluation Toolbox. Assessing the Socio-Economic Impact of RTD-Policies. (Fahrenkrog, G., W. Polt, J. Rojo, A. Tubke, and K. Zinocker, eds.) EUR 20382 EN. European Commission. Sevilla, Spain. 271 pp.

Liu, C. Y. and R. M. Hsieh. 2006. Review and foresight for the entrepreneurship management research: An exploration of theory and framework. J. Entrep. Res. 1:1–43. (in Chinese)

Ratcliffe, J. 2002. Scenario planning: Strategic interviews and conversations. Foresight 4:19–30.

Tzai, C. Y. 2006. Strategic Planning on the Development of Taiwan Agricultural Biotechnology Industry. National Applied Research Laboratories. Taipei. 163 pp. (in Chinese)

Wang, P. C. 2007. Formation of Goals and Development of Outcome Indicators of Science and Technology Programs. National Applied Research Laboratories. Taipei. 185 pp. (in Chinese)

Wang, P. C. 2008. The Strategies for Agro-biotechnological Development in Taiwan Based on Global Trend Analysis. National Applied Research Laboratories. Taipei. 118 pp. (in Chinese)

Wu, C. T. 2002. Relation Extraction and Concept Map Construction in Text Documents. National Cheng Kung University. Tainan. 59 pp. (in Chinese)

Output Analysis of the Research and Development Achievements and Their Value-Added Applications: A Case Study of Taiwan Agricultural Research Institute

Yi-Ying Lee[1], Wei-Chun Chen[2], and Shen-Chen Yang[3,*]

Abstract

Lee, Y. Y., W. C. Chen, and S. C. Yang. 2016. Output analysis of the research and development achievements and their value-added applications: A case study of Taiwan Agricultural Research Institute. J. Taiwan Agric. Res. 65(1):70–83.

Due to rapid changes in domestic and foreign industries as well as the impacts of socio-economic environment, agricultural sector should bring about a systematic and integrative approach to carry out research and development programs coping with important issues. In this study, research achievements of Taiwan Agricultural Research Institute (TARI) in the last five years were analyzed, and the number of their beneficiaries, the output forms, the development periods, the major topics, the highlights and others aspects were investigated. Further, we used the method of text mining to capture the keywords of each research, and classified the results into information forms. We found that the current TARI's research achievements were focused on cultivar breeding programs, pests and diseases control measures, and health management cultivation systems. The major beneficiaries of those researches are farmers and farmers' organizations. According to the results, we provide a method that can assist TARI organize new teams to conform different agricultural issues. In this way, it would be more effective to meet the agricultural policy and consumer demands and to obtain significant benefits.

Key words: Agricultural issues, Interdisciplinary team, Strategy layout.

Received: April 28, 2015; Accepted: July 17, 2015.

* Corresponding author, e-mail: yang@tari.gov.tw

1 Research Fellow, Taiwan Agricultural Science and Technology Resources Logistics Management Association, Taipei, Taiwan, ROC.

2 Assistant Research Fellow, Taiwan Agricultural Science and Technology Resources Logistics Management Association, Taipei, Taiwan, ROC.

3 Senior Executive Officer, Director-General Office, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 65(1):84–91 (2016)
DOI: 10.6156/JTAR/2016.06501.08

研究報告

台灣水稻褐飛蝨生物小種之調查

黃守宏[1,*] 鄭清煥[2] 陳秋男[3] 吳文哲[4]

摘要

黃守宏、鄭清煥、陳秋男、吳文哲。2016。台灣水稻褐飛蝨生物小種之調查。台灣農業研究 65(1):84–91。

褐飛蝨 [*Nilaparvata lugens* (Stål)] 為東亞地區之重要水稻遷移性害蟲，對水稻為害性甚為嚴重，東亞各國 (含台灣) 都以抗蟲品種作為主要的防治方法。為瞭解自海外遷入之褐飛蝨族群對台灣育成之抵抗性水稻品種的衝擊，本研究在 2007–2010 年檢定台灣 4 個不同地區褐飛蝨族群，於 'Mudgo' (具 *Bph1* 抗性基因)、'H105' (具 *bph2* 抗性基因)、'RathuHeenati' (具 *Bph3* 及 *Bph17* 抗性基因) 及 'Babawee' (具 *bph4* 抗性基因) 等 4 個具不同抗性基因水稻品種上之致害性表現。結果顯示各地區褐飛蝨族群在 'Mudgo' 及 'H105' 等抗性水稻品種上，有 75–100% 雌蟲個體能存活超過 5 d，其中有 65–100% 雌蟲腹部可膨大；在 'Babawee' 抗性水稻品種上，有 20–83% 雌蟲能存活超過 5 d，其中有 0–28% 雌蟲腹部可膨大，且近年來有逐漸增加之趨勢；在 'RathuHeenati' 抗性水稻品種上，大多數地區族群雌蟲能存活 5 d 者在 57% 以下，其中只有 5% 以下雌蟲腹部可膨大。顯示抵抗褐飛蝨之水稻品種之抗蟲性受 *Bph1* 或 *bph2* 基因所支配者，由於相對應之第 2 型及第 3 型生物小種之出現而崩潰；近幾年來水稻抗性基因受 *bph4* 所支配者，也因相對應之第 5 型生物小種蟲數之出現比率增加而逐漸失去效力。因此，積極引入不同抗性基因於水稻育種系統，以因應褐飛蝨生物小種在台灣發生之現況，已成為當務之急。

關鍵詞：水稻、褐飛蝨、生物小種、抗性基因。

前言

褐飛蝨 [*Nilaparvata lugens* (Stål)] 為東亞地區之水稻重要遷移性害蟲，其個體小、世代短、繁殖力強，嚴重危害可造成水稻全面枯萎 (蝨燒)，影響產量損失至鉅，東亞各國 (含台灣) 多以抗蟲品種作為害蟲整合防治方法之主幹。栽植抗蟲品種可有效抑制害蟲族群之增長與為害，並可以與其他防治方法相配合，不會增加防治成本，且減少防治用藥次數，有利於天敵之立足及繁衍，為一相當經濟且有效的防治手段 (Heinrichs 1986, 1994; Cheng 2003)。台灣於 1969 年開始著手進行抗褐飛蝨等重要害蟲之水稻育種研究，在 1973 年與國際稻米研究所 (International Rice Research Institute) 同時發表台灣第 1 個抗褐飛蝨秈稻品種「嘉農秈 11 號」，1982 年發表第一個抗褐飛蝨稉稻品種「台農 68 號」(Cheng 2003)。台灣自 2007 年以後，水稻主要栽培品種以「台南 11 號」為主，此品種含有抗褐飛蝨之 *Bph1* 基因，目前栽植抗褐飛蝨水稻品種之種植面積，占水稻總栽培面積的一半以上 (Yang & Su 2008)。惟因在東亞地區長時期且大面積種植含有 *Bph1* 抗性基因之水稻品種，很有可能因產生有害生物小種而失去抗性，是為栽植抗性品種推廣最大的隱憂 (Cheng 1985; Heinrichs 1994)，如台灣近年來

投稿日期：2015 年 4 月 24 日。接受日期：2015 年 7 月 21 日。
[*] 通訊作者：shhuang@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系副研究員。台灣 嘉義市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系前研究員兼系主任。台灣 嘉義市。
[3] 國立台灣大學昆蟲系兼任教授。台灣 台北市。
[4] 國立台灣大學昆蟲系教授。台灣 台北市。

因褐飛蝨生物小種改變之關係，使得「台南 11 號」原含有之抗性基因失去效用，而遭受褐飛蝨嚴重危害，產生蝨燒之現象。

褐飛蝨對抗蟲品種之適應性係受多基因 (polygenes) 所控制，當由同一抗性基因之水稻品種大面積栽植後，褐飛蝨個體就會逐漸適應及生存於該抗蟲品種上，發展出相對應之有害生物小種 (virulent biotype)，使原有之抗蟲品種失去抗蟲效力。國際稻米研究所早於 1973 年即培育出 ‘IR26’ (含抗褐飛蝨基因 *Bph1*) 來對抗褐飛蝨之為害，但於 3 年後，褐飛蝨第 2 型生物小種 (biotype 2) 大量出現，而使 ‘IR26’ 遭受蝨燒而崩潰。在 1976 年國際稻米研究所又推出抗性品種 ‘IR36’ (含抗褐飛蝨基因 *bph2*)，但於 6 年後，褐飛蝨第 3 型生物小種 (biotype 3) 出現；又於 1982 年推出抗蟲品種 ‘IR56’ (含抗褐飛蝨基因 *Bph3*)，一般相信褐飛蝨第 4 型生物小種 (biotype 4) 的發生是可被預期的 (Rombacher & Gallagher 1994)。如前述，中國大陸在 1975 年大量推廣種植雜交稻 (hybrid rice)，並導入褐飛蝨抗性基因，以抑制其猖獗為害，確保糧食生產 (Sogawa *et al*. 2003)，但在 1980 年代末期，褐飛蝨第 2 型生物小種已出現。而隨著其他抗性基因 (*bph2*) 之導入，褐飛蝨之第 2 型生物小種逐漸轉變成第 3 型生物小種 (Sogawa *et al*. 1987)。水稻飛蝨類害蟲遷入日本，亦分別於 1988 年及 1997 年偵測發現褐飛蝨由第 1 型生物小種占優勢，轉變成由第 2 型生物小種占優勢，再逐漸轉變成由第 2 及第 3 型生物小種占優勢之情況 (Tanaka & Matsumura 2000)。

在台灣，針對褐飛蝨之為害，採取主要防治方法為以抗蟲品種為基礎，栽植抗褐飛蝨水稻品種 (含有 *Bph1* 及 *bph2* 抗性基因) 之種植面積，占水稻總栽培面積一半以上。然而對於遷入褐飛蝨的生物小種之演變，並無系統性偵測報告。持續監測生物小種之變化，為以抗蟲品種為整合管理基礎不可或缺之資訊。發生於台灣第 2 期水稻之褐飛蝨族群，多為海外遷入族群所繁衍之後代 (Huang *et al*. 2009, 2010b)；不同地區之遷入族群，其生物小種之種類及特性亦有所差異，本研究目的在於偵測及瞭解遷入台灣褐飛蝨生物小種之演變，藉以避免因有害生物入侵之變化，而造成台灣水稻遭受嚴重之被害損失。

材料與方法

遷入褐飛蝨族群之採集

為了監測台灣各地區水稻褐飛蝨發生及為害之族群，是否由不同海外地區遷入，以及其進入台灣後之生物小種變化情況。自 2007 年開始，於台灣西部之台中 + 彰化、嘉義、高雄、屏東及花蓮 + 台東等 4 個主要水稻栽植地區，採集褐飛蝨之族群回室內大量繁殖於感蟲水稻品種「台農 67 號」上，供作進一步檢定之材料。

檢定方法

本檢定方法為參考 Tanaka (2000) 方法稍加改良後實施，由各地採集之褐飛蝨，在感蟲稻種「台農 67 號」上大量繁殖後，取得大量且蟲齡一致之初羽化短翅型雌蟲個體，每 5 隻為 1 個重覆，分別接種於含有 *Bph1*、*bph2*、*Bph3* 及 *bph4* 抗性基因之水稻品種 ‘Mudgo’、‘H105’、‘RathuHeenati’ 及 ‘Babawee’ 等水稻辨別品種 (differential varieties) (Athwal & Pathak 1972; Lakashminarayana & Khush 1977)， 每處理 6 重覆。其中，‘RathuHeenati’ 另外含有抗性基因 *Bph17* 及 2 個微效基因 (Sun *et al*. 2005; Jairin *et al*. 2007)。各供試辨別水稻品種於種植後 35 d 左右，約在分蘗盛期時，僅留約 15 cm 長之主莖，其他分蘗株全部剪除，所留之主莖使用一透明圓筒型塑膠筒 (直徑 6.5 cm、高 30 cm)，接入剛羽化之 1 日齡雌成蟲 (腹部扁平) 至圓筒中，並在圓筒之上端開口，以棉花塞住。每日觀察接入之蟲體，期間雌蟲腹部膨大者或能存活至第 5 日者，視為可在該品種水稻尚生存，為具有致害性者 (Tanaka 2000)。本試驗在溫度 28–30℃，相對溼度 85–95% 之室內環境下進行。

生物小種發生之判定

從上述檢定方法，於接蟲 5 d 後，檢視雌成蟲個體之存活數，及其腹部膨脹者之比例，供作判定該族群之生物小種的發生比例。在其

羽化後幾天，致害型之雌成蟲個體之腹部會變膨大；非致害型之雌成蟲則腹部維持在較扁平之情況 (Tanaka 1999)。然而，部分雌成蟲之腹部既不膨大也不扁平，介於兩者之間者，則以其能否在供試品種上存活 5 d 後來區分。腹部膨大之雌成蟲及能在抗蟲品種上存活 5 d 以上者，表示可以良好適應於該辨別水稻品種上，其卵巢可正常發育，具繁殖後代的能力，故視為具致害能力 (Tanaka 2000)。

資料分析方法

本研究使用 SAS-EG (Version 4.0, 2006) 統計套裝軟體進行資料分析。資料先進行變方分析 (ANOVA)，不同處理間呈現顯著差異後，再以最小顯著差異法 (Fisher's least significant difference; LSD)，分析比較各處理間之差異。

結果

台灣主要水稻栽培地區之褐飛蝨雌成蟲在不同抗性基因水稻之存活率

由表 1 之結果顯示，在連續 4 yr (2007–2010 年) 之調查結果，在台灣 4 個水稻主要栽培地區所採集之褐飛蝨族群，有 75% 以上之雌成蟲個體，可以在含有抗性基因 *Bph1* 或 *bph2* 之水稻品種 'Mudgo' 及 'H105' 上存活超過 5 d。在具 *Bph3* 及 *Bph17* 抗性基因之水稻品種 'RathuHeenati' 上，除在 2009 年台東花蓮地區族群之存活率達 80% 外，其餘各地區大多低於 57%。在具抗性基因 *bph4* 品種 (Babawee) 上，各地區族群之存活率在 20–83% 之間。

各主要水稻栽培地區之褐飛蝨雌成蟲在不同抗性基因水稻取食後腹部之膨大率

在上述 4 yr 調查各地區褐飛蝨族群之雌成蟲，在 4 個抗性基因辨別水稻品種上取食後之腹部膨大率的結果 (表 2)，顯示除 2007 年高雄屏東地區族群在含有抗性基因 *Bph1* 或 *bph2* 之水稻品種 'Mudgo' 及 'H105' 上。雌蟲腹部膨大率為 65% 外，其餘各地區族群在此 2 個抗性基因品種上均為 77% 以上，甚至高達 100%，顯示族群中絕大部分個體已能為害含有該兩種抗蟲基因之稻種。在具 *Bph3* 及 *Bph17* 抗性基因之水稻品種 ('RathuHeenati') 上，雌蟲腹部膨大率均低於 5%，顯示族群中大部分的個體，尚無法適應於含有此抗蟲基因之稻種。在具抗性基因 *bph4* 品種 ('Babawee') 上，於 2007–2008 年為 0–20%，在 2009 年為 10–23%，2010 年間則增加至 22–28%，有逐年上升之趨勢。

討論

褐飛蝨的致害性 (virulent) 表現是受到數量遺傳因子 (polygenic) 的控制 (Den Hollonder & Pathak 1981; Sogawa 1981; Cheng 1985)，如是，其致害性會呈現連續性的表現，而非呈現絕對的致害型及非致害型的狀態 (Tanaka 1999)。因此，在褐飛蝨族群中，致害型個體之所占比率，即表示該族群致害性之程度。在連續 4 yr (2007–2010 年) 在台灣西部及東部調查褐飛蝨對具不同抗性基因水稻辨別品種上，雌成蟲存活率及腹部膨大率結果，顯示在各地區所採集到之褐飛蝨族群的個體，對具抗性基因 *Bph1* 或 *bph2* 之水稻品種植株上，至少有 80% 以上雌成蟲之存活率及腹部呈現膨大現象。可見已分別能適應於 *Bph1* 及 *bph2* 抗性基因的第 2 型及第 3 型生物小種，且已普遍存在於台灣。此一結果與日本利用判別水稻品種偵察遷入九州之褐飛蝨的為害反應，發現有 49–98% 的雌成蟲可為害含有抗蟲基因 *Bph1* 之稻種，有 45–87% 之個體可為害含有抗蟲基因 *bph2* 之稻種相同 (Tanaka & Matsumura 2000; Myint *et al*. 2009)。由此可知，含有抗蟲基因 *Bph1* 及 *bph2* 稻種之抗性顯然已經崩潰，同樣現象亦在韓國發現 (Seo *et al*. 2009)。在台灣稻田栽植含有 *Bph1* 抗蟲基因之「台稉 16 號」及栽植含有 *bph2* 抗蟲基因之「台中秈 10 號」，分別於 1990 年代初期及末期就有被蝨燒之情況發生，足見遷入地的褐飛蝨業已隨遷出地之生物小種的變化而改變 (Cheng 2003)。

其後更因由海外遷入的褐飛蝨能在 *Bph1* 及 *bph2* 基因所支配之抗蟲水稻品種上生存之個體比例逐年增高，終於在 1990 年代間，無

表 1. 台灣 4 個主要水稻栽培地區之褐飛蝨雌成蟲對具不同抗性基因水稻之存活率 (2007–2010 年)。

Table 1. Female's survival rate (%, mean ± SE) of *Nilaparvata lugens* strain on the rice varieties carrying resistance genes in Taiwan (2007–2010).

Rice variety	Resistant gene	Female's survival rate (%) of BPH strain															
		2007				2008				2009				2010			
		TC[z]	C	PK	TH	TC	C	PK	TH	TC	C	PK	TH	TC	C	PK	TH
Mudgo	*Bph1*	90 a[y] (6.8)[x]	87 a (6.7)	85 a (5.0)	85 a (5.0)	93 a (4.2)	93 a (4.2)	100 a (0.0)	77 a (8.0)	87 ab (4.2)	93 a (4.2)	93 a (4.2)	90 a (4.5)	88 a (3.3)	90 a (3.3)	92 a (3.3)	88 a (3.3)
H105	*bph2*	93 a (4.2)	83 a (6.1)	75 a (5.0)	80 a (12.6)	97 a (3.3)	97 a (3.3)	100 a (0.0)	87 a (6.7)	93 a (4.2)	100 a (0.0)	83 ab (3.3)	87 a (4.2)	94 a (3.1)	86 a (3.1)	92 a (3.3)	90 a (3.3)
Rathu Heenati	*Bph3*, *Bph17*	40 b (8.9)	20 b (7.3)	20 b (8.2)	40 b (12.6)	57 b (6.1)	37 b (8.0)	40 c (5.2)	50 b (4.5)	43 c (3.3)	53 b (4.2)	47 c (4.2)	80 a (5.2)	34 b (4.3)	40 b (4.2)	40 c (4.2)	46 c (4.3)
Babawee	*bph4*	80 a (8.9)	20 b (7.3)	30 b (10.0)	50 b (4.5)	70 b (4.5)	47 b (4.2)	67 b (4.2)	83 a (6.1)	67 b (13.3)	63 b (3.3)	73 b (4.2)	77 a (3.3)	42 b (4.7)	48 b (3.3)	70 b (3.3)	64 b (4.0)

[z] TC: Taichung and Changhua areas; C: Chiayi area; PK: Pingtung and Kaohsiung areas; TH: Taitung and Hualien areas.
[y] Means followed by the same letter in a column do not statistically differ by the LSD test at the 5% level.
[x] Figures in parentheses indicate the SE of female's survival rate.

表 2. 台灣 4 個主要水稻栽培地區之褐飛蝨雌成蟲對具不同抗性基因水稻之腹部膨大率 (2007–2010 年)。

Table 2. Female with swollen abdomens rate of *Nilaparvata lugens* strain on the rice varieties carrying different resistance genes in Taiwan (2007–2010).

Rice variety	Resistant gene	Female with swollen abdomens rate (%) of BPH strain															
		2007				2008				2009				2010			
		TC[z]	C	PK	TH	TC	C	PK	TH	TC	C	PK	TH	TC	C	PK	TH
Mudgo	*Bph1*	90 a[y] (6.8)[x]	87 a (6.7)	65 a (5.0)	85 a (5.0)	93 a (4.2)	83 a (6.1)	100 a (0.0)	77 a (8.0)	87 a (4.2)	93 a (4.2)	93 a (4.2)	90 a (4.5)	88 a (3.3)	90 a (5.3)	92 a (3.3)	88 a (3.3)
H105	*bph2*	93 a (4.2)	83 a (6.1)	65 a (5.0)	80 a (12.6)	97 a (3.3)	80 a (8.9)	100 a (0.0)	87 a (6.7)	93 a (4.2)	93 a (4.2)	83 a (3.3)	77 b (6.1)	94 a (3.1)	86 a (3.1)	92 a (3.3)	90 a (3.3)
Rathu Heenati	*Bph3*, *Bph17*	3 b (3.3)	0 b (0.0)	5 b (5.0)	3 b (3.3)	3 b (3.3)	3 b (3.3)	0 c (0.0)	0 c (0.0)	0 c (0.0)	3 b (3.3)	0 c (0.0)	3 d (3.3)	0 c (0.0)	0 c (0.0)	0 c (0.0)	0 c (0.0)
Babawee	*bph4*	10 b (4.5)	0 b (0.0)	10 b (5.8)	10 b (6.8)	10 b (4.5)	7 b (4.2)	7 b (4.2)	20 b (7.3)	20 b (7.3)	10 b (4.5)	23 b (8.0)	23 c (3.3)	28 b (3.3)	24 b (2.7)	22 b (2.0)	28 b (3.3)

[z] TC: Taichung and Changhua area; C: Chiayi area; PK: Pingtung and Kaohsiung area; TH: Taitung and Hualien area.
[y] Means followed by the same letter in a column do not statisitically differ by the LSD test at the 5% level.
[x] Figures in parentheses indicate the SE of female with swollen abdomens rate.

論含有 *Bph1* 或 *bph2* 抗蟲基因之水稻品種的抗蟲性已完全崩潰，使台灣多年培育之抗褐飛蝨的 40 餘種水稻已完全失去抗蟲效力。目前只剩「台農 69 號」 (TNG61M510-1/*Oryza-rufipogon*) 仍具抗性 (抗性基因可能為 *Bph3*) (Huang *et al*. 1985)，惜因未被列為良質米推薦品種而未被廣泛栽植。

在含有 *Bph3* 及 *Bph17* 抗性基因之水稻品種 'RathuHeenati' 上之檢定結果顯示，各地區族群雌成蟲之存活率及腹部膨大率分別在 50% 及 5% 以下，顯示褐飛蝨族群中能適應在具此 2 個抗性基因品種之個體發展相對較為緩慢。害蟲在抗蟲品種上比感蟲品種之取食量少、個體小、存活率低、產卵量少及族群增殖率低 (Painter 1951, 1958; Kogan 1982)，Hu *et al*. (2010) 分析褐飛蝨於抗蟲及感蟲水稻上之生命表，進一步證實上述特性。此結果也可說明，生物小種發生比例之調查可由其族群在各抗蟲品種上之存活率及雌蟲腹部膨大與否之情況得知。

一般認為作物抗蟲遺傳由單因子 (monogene) 所支配者較由數量因子 (polygene) 所支配者，更易產生有害生物小種 (biotype)，此為原先育成之含有單主效抗蟲基因，如 *Bph1* 或 *bph2* 之「抗蟲品種」在大面積栽植後 3–5 yr 即行崩潰，失去抗蟲性之主要原因 (Pathak 1970; Gallun 1972; Cheng 1985)。在日本，檢定褐飛蝨在 'RethuHeenati' (含抗蟲基因 *Bph3* 及 *Bph17*) 上之存活率及雌蟲腹部膨大率，維持在 5.0% 以下之低比率 (Tanaka & Matsumura 2000; Myint *et al*. 2009)，此情況與在 2006–2009 年與台灣監測之結果相近。由於遷入台灣之褐飛蝨來源地區以中國華南地區為主，其次為越南北部及菲律賓呂宋島等地 (Huang *et al*. 2010a)。惟在 2009 年台東花蓮地區之族群，在 'RathuHeenati' 之存活率高達 80% (表 1)，但其雌蟲腹部膨大率僅 3% (表 2)，不代表該族群可造成嚴重危害之能力，可能原因為於當年東部所採集到族群之來源，主要來自菲律賓地區。在菲律賓地區，含 *Bph3* 基因之品種自 1982 年即陸續推廣種植 (含 'IR56'、'IR60'、'IR62'、'IR68'、'IR72' 及 'IR74' 等) (Brar *et al*. 2009)，在此情況下，該地區之褐飛蝨族群可能已逐漸適應於 *Bph3* 基因之水稻品種。另方面在大多數情況下，遷入台灣西部之褐飛蝨為由中國大陸華南地區遷入之族群 (Huang *et al*. 2010a)。由於遷入台灣西部之族群無法越過台灣中部 3,000 m 高山之阻隔遷入台灣東部地區，所以越靠近南部及東部的褐飛蝨族群，越有機會混合中國大陸華南與菲律賓呂宋島的族群，而表現出與中國華南地區不同族群之特性 (Otuka *et al*. 2012)。此外，花東地區之褐飛蝨族群，目前推測也可能為中國大陸華南地區族群遷移至台灣南部，再沿著花東縱谷向上遷移至該地區，甚至是直接由菲律賓地區遷入，情況需視當時的氣流條件而定。

在具抗性基因 *bph4* 品種 'Babawee' 上，於 4 年監測各地區族群雌成蟲存活率可高達 83%，雌蟲腹部膨大率之情況有逐漸上升之趨勢，至 2010 年為 22–28%。此結果顯示，適應於具抗性基因 (*bph4*) 之褐飛蝨第 5 型生物小種比例逐漸上升。日本檢定在含抗性基因 *bph4* 上，雌蟲之存活率及腹部膨大率分別為 20% 及 7.5%，與台灣相比其致害性較低，此情況可能顯示近年來在台灣能適應於其他抗性品種 (*Bph1* 及 *bph2* 除外) 之褐飛蝨族群有逐漸增加之趨勢。而此類情況，與遷出地區 (中國大陸華南地區、北越及菲律賓呂宋島) 族群之變化有無密切之關聯，亟待進一步深入探討。

由上述監測情況及以往在東亞熱帶地區栽培抵抗褐飛蝨水稻品種的現象顯示，褐飛蝨族群內的個體對抗蟲品種之適應性具多樣性變異，經短短數年同一抗蟲基因所支配品種的汰選，能適應於抗蟲品種之個體，在族群中所占比例就逐漸增加，終使該抗蟲品種之抗蟲性完全失去效用。Sogawa (1981) 於室內試驗雜交所選育出之第 1、2 及 3 型褐飛蝨生物小種，藉以探討生物小種致害能力之遺傳行為，結果顯示當第 2 或 3 型生物小種與第 1 型生物小種雜交後，其後代之生物特性，如寄主偏好性、取食能力、若蟲發育期及死亡率等，均偏似第 1 型生物小種；以 F_1 與親本回交，該等生物特性亦無明顯分離現象，表示生物小種對抗蟲品種之致害能力係受數量因子所支配，而第 1 型

生物小種對第2或3型生物小種均具顯性作用。類似研究亦出現在 Cheng (1985) 之報告，第 1 型生物小種對第 2 型生物小種具顯性效應，對第 3 型生物小種具部分顯性效應；而第 3 型生物小種對第 2 型生物小種則具顯性效應。

由於褐飛蝨為害抗蟲品種的能力受數量因子所支配，在抗蟲品種大面積栽植後，即會產生生物小種。但不可否認地，栽植抗蟲品種仍然是對付褐飛蝨等 r 型害蟲最有效，為整合管理之基石，只要避免在大面積栽植由同一種抗蟲基因之抗蟲品種，使用多品系品種，在同一品種轉入兩個主效基因 (major gene)、附加多個微效基因 (minor gene)，或育成由數個微效基因所支配之抗蟲品種，甚至選育出容忍性品種，藉由含不同抗蟲基因之品種輪流種植等方式，均可避免生物小種之產生，而延長抗蟲品種之種植壽命 (Cheng 1985; Hare 1994; Panda & Khush 1995; Huang *et al*. 2009, 2010b)。

誌謝

本試驗資料統計分析，感謝農業試驗所嘉義分所農藝系廖大經先生的建議與協助。試驗進行期間承蒙蕭繡琴、楊雪鳳及賴佳鴻等小姐的協助，使試驗得以順利完成，在此一併誌謝。

引用文獻

Athwal, D. S. and M. D. Pathak. 1972. Genetics of resistance to rice insects. p.375–386. *in*: Rice Breeding. (Breth, S. A., ed.) International Rice Research Institute. Los Baños, Philippines. 740 pp.

Brar, D. S., P. S. Virk, K. K. Jena, and G. S. Khush. 2009. Breeding for resistance to planthoppers in rice. p.401–427. *in*: Planthoppers: New Threats to the Sustainability of Intensive Rice Production Systems in Asia. (Heong, K. L. and B. Hardy, eds.) International Rice Research Institute. Los Baños, Philippines. 460 pp.

Cheng, C. H. 1985. Interactions between biotypes of the brown planthopper and rice varieties. J. Agric. Res. China 34:299–314. (in Chinese with English abstract)

Cheng, C. H. 2003. Review and prospects of integrated management of rice insect pests in Taiwan. p.11–38. *in*: Proceedings of the Integrated Management of Crops Pests in Taiwan. July 10, 2003. Chiayi, Taiwan. TARI Special Publ. No. 106, Chiayi. (in Chinese with English abstract)

Den Hollander, J. and P. K. Pathak. 1981. The genetics of the ‘biotypes’ of the rice brown planthopper, *Nilaparvatalugens*. Entomol. Exp. Appl. 29:76–86.

Gallun, R. L. 1972. Genetic interrelationship between host plants and insects. J. Environ. Qual. 1:259–265.

Hare, J. D. 1994. Status and prospects for an integrated approach to the control of rice planthoppers. p.615–632. *in*: Planthoppers: Their Ecology and Management. (Denno, R. F. and T. J. Perfect, eds.) Chapman and Hall. New York. 799 pp.

Heinrichs, E. A. 1986. Perspectives and directions for the continued development of insect-resistant rice varieties. Agric. Ecosyst. Environ. 18:9–36.

Heinrichs, E. A. 1994. Host plant resistance. p.517–547. *in*: Biology and Management of Rice Insects. (Heinrichs, E. A., ed.) Wiley Eastern. New Delhi, India. 779 pp.

Hu, L. X., H. Chi, J. Zhang, Q. Zhou, and R. J. Zhang. 2010. Life-table analysis of the performance of *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) on two wild rice species. J. Econ. Entomol. 103:1628–1635.

Huang, C. S., R. H. Buu, C. C. Chen, and C. H. Cheng. 1985. Development of rice variety Tainung 69. J. Agric. Res. China 34:125–134. (in Chinese with English abstract)

Huang, S. H., C. H. Cheng, C. N. Chen, and W. J. Wu. 2009. The trend of occurrence and prospective control measures of rice insect pests in Taiwan. p.137–147. *in*: Proceedings of Symposium on Achievements and Perspectives of Rice Protection in Taiwan. July 9, 2009. Chiayi, Taiwan. Taiwan Agricultural Research Institute. Taichung. (in Chinese with English abstract)

Huang, S. H., C. H. Cheng, C. N. Chen, W. J. Wu, and A. Otuka. 2010a. Estimating the immigration source of rice planthoppers, *Nilaparvata lugens* (Stål) and *Sogatella furcifera* (Horváth) (Homoptera: Delphacidae), in Taiwan. Appl. Entomol. Zool. 45:521–531.

Huang, S. H., C. H. Cheng, and W. J. Wu. 2010b. Possible impacts of climate change on rice insect pests and management tactics in Taiwan. Crop Environ. Bioinforms. 7:269–279. (in Chinese with English abstract)

Jairin, J., K. Phengrat, S. Teangdeerith, A. Vanavichit, and T. Toojinda. 2007. Mapping of a broad-spectrum brown planthopper resistance gene, *Bph3*, on rice chromosome 6. Mol. Breeding 19:35–44.

Kogan, M. 1982. Plant resistance in pest management. p.93–134. *in*: Introduction to Insect Pest Manage-

ment. (Metcalf, R. L. and W. H. Luckmann, eds.) Wiley. New York. 577 pp.

Lakashminarayana, A. and G. S. Khush. 1977. New genes for resistance to the brown planthopper in rice. Crop Sci. 17:96–100.

Myint, K. K. M., H. Yasui, M. Takagi, and M. Matsumnra. 2009. Virulence of long-term laboratory populations of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål), and whitebacked planthopper, *Sogatella furcifera* (Horváth) (Homoptera: Delphacidae), on rice differential varieties. Appl. Entomol. Zool. 44:149–153.

Otuka, A., S. H. Huang, S. Sanada-Morimura, and M. Matsumura. 2012. Migration analysis of *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) from the Philippines to Taiwan under typhoon-induced windy conditions. Appl. Entomol. Zool. 47:263–271.

Painter, R. H. 1951. Insect Resistance in Crop Pants. Macmillan. New York. 520 pp.

Painter, R. H. 1958. Resistance of plants to insects. Annu. Rev. Entomol. 3:267–290.

Panda, N. and G. S. Khush. 1995. Host Plant Resistance to Insects. CAB International. Wallingford. 431 pp.

Pathak, M. D. 1970. Genetics of plants in pest management. p.138–158. *in*: Concepts of Pest Management. (Rabb, R. L. and F. E. Guthrie, eds.) North Carolina State Univ. Raleigh, NC. 242 pp.

Rombacher, M. C. and K. D. Gallagher. 1994. The brown planthopper: Promises, problems, and prospects. p.693–709. *in*: Biology and Management of Rice Insects. (Heinrichs, E. A., ed.) Wiley Eastern. New Delhi, India. 779 pp.

Seo, B. Y., J. K. Jung, B. R. Choi, H. M. Park, and B. H. Lee. 2009. Resistance-breaking ability and feeding behavior of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, recently collected in Korea. p.303–314. *in*: Planthoppers: New Threats to the Sustainability of Intensive Rice Production Systems in Asia. (Heong, K. L. and B. Hardy, eds.) International Rice Research Institute. Los Baños, Philippines. 460 pp.

Sogawa, K. 1981. Hybridization experiments on three biotypes of the brown planthopper, *Nilaparvata lugnes* (Homoptera: Delphacidae) at the IRRI, the Philippines. Appl. Entomol. Zool. 16:193–199.

Sogawa, K., G. J. Lin, and J. H. Shen. 2003. A review on hyper-susceptibility of Chinese hybrid rice to insect pests. Chinese J. Rice Sci. 17:23–30.

Sogawa, K., Soekirno, and Y. Raksadinata. 1987. New genetic makeup of brown planthopper (BPH) populations in Central Java, Indonesia. Intl. Rice Res. Newsl. 12:29–30.

Sun, L., C. Su, C. Wang, H. Zai, and J. Wan. 2005. Mapping of a major resistance gene to brown planthopper in the rice cultivar Rathu Heenati. Breed. Sci. 55:391–396.

Tanaka, K. 1999. Quantitative genetic analysis of biotypes of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*: Heritability of virulence to resistant rice varieties. Entomol. Exp. Appl. 90:279–287.

Tanaka, K. 2000. A simple method for evaluating the virulence of the brown planthopper. Intl. Rice Res. Newsl. 25:18–19.

Tanaka, K. and M. Matsumura. 2000. Development of virulence to resistant rice varieties in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae), immigrating into Japan. Appl. Entomol. Zool. 35:529–533.

Yang, M. T. and T. C. Su. 2008. Promotion and implementation of good-quality rice in Taiwan. http://www.coa.gov.tw/view.php?catid=17817 (visit on 4/25/2015)

Bioassay of the Biotypes of Brown Planthopper in Taiwan

Shou-Horng Huang[1,*], Ching-Huan Cheng[2], Chiou-Nan Chen[3], and Wen-Jer Wu[4]

Abstract

Huang, S. H., C. H. Cheng, C. N. Chen, and W. J. Wu. 2016. Bioassay of the biotypes of brown planthopper in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 65(1):84–91.

The brown planthopper [*Nilaparvata lugens* (Stål)] is the most important migratory pests of rice (*Oryza sativa*) in East Asia. Using resistant variety is considered the most economic and effective measures for controlling this pest. Bioassay tests were conducted during 2007–2010 for figuring out the possible existence of any biotype of the brown planthopper collected from the four major rice cultivated districts. Four differential rice varieties, 'Mudgo' (carrying a resistant gene *Bph1*), 'H105' (carrying a resistant gene *bph2)*, 'RathuHeenati' (carrying two resistant genes *Bph3* and *Bph17)*, and 'Babawee' (carrying a resistant gene *bph4*), were used to distinguish the existent rate of biotypes. The newly emerged brachypterous females from each district were released onto each biotype indicator rice plants. Results indicated that the survival rate of brown planthopper female caged on the varieties with resistant genes *Bph1* and *bph2* ranged from 75 to 100%, and the females with swollen abdomen rate ranged 65–100%. Whereas, the survival rate and swollen abdomen rate of the caged females on the variety with resistant gene *bph4* ranged 20–83% and 0–28%, respectively. In the variety 'RathuHeenati' carrying two resistant genes *Bph3* and *Bph17*, the survival rate and swollen abdomen rate of female were under 57% and 5%, respectively. Results indicated that the varieties with resistant genes *Bph1* and *bph2* had been broken down by the virulent biotypes 2 and 3, and the resistant varieties with gene *bph4* might become ineffective due to the biotype 5 in near future. Breeding varieties carrying more than one resistant gene to cope with the virulent biotypes of brown planthopper is urgently needed in Taiwan.

Key words: Rice, *Oryza sativa*, Brown planthopper, Biotype, Resistant gene.

Received: April 24, 2015; Accepted: July 21, 2015.

* Corresponding author, e-mail: shhuang@dns.caes.gov.tw

1 Associate Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

2 Former Research Fellow and Head, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

3 Adjunct Professor, Department of Entomology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

4 Professor, Department of Entomology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 65(1):92–102 (2016)
DOI: 10.6156/JTAR/2016.06501.09

研究報告

稻稈傳播水稻徒長病可能性之探討

林素禎[1,*] 鄭春玉[2] 王朝儀[2] 吳宗哲[2] 陳啟予[3]

摘要

林素禎、鄭春玉、王朝儀、吳宗哲、陳啟予。2016。稻稈傳播水稻徒長病可能性之探討。台灣農業研究 65(1):92–102。

近年來由 *Fusarium fujikuroi* 引起的水稻徒長病 (bakanae disease of rice) 在台灣各地有逐漸嚴重的趨勢，為了瞭解稻稈是否可傳播此病害，本文將探討不同土壤中此病原菌在稻稈上之殘存能力，以作為此病害防治之參考。本研究在行政院農業委員會農業試驗所實驗室中進行，試驗中所使用之水稻徒長病菌 (*Fusarium fujikuroi*) 由國立中興大學植物病理學系提供，水稻品種為「台農 71 號」。試驗開始於 2013 年 4 月，稻稈接種病原菌培養 7 d 後加入土壤中，稻稈與土壤比例為重量比 1 : 100。稻稈加入土壤中，其病原菌初始濃度為 2.0×10^5 cfu g^{-1} soil，在第 14、28、60、90、120 及 150 d 後從土壤中取出稻稈，測定稻稈上病原菌之存活率。稻稈在土壤中 14 d 時，水稻徒長病菌存活率以屏東縣萬巒鄉土壤最高 (126%)，其次為桃園縣觀音鄉土壤 (53%)，第 3 為彰化縣芬園鄉土壤 (41%)，而彰化縣二林鎮土壤最低 (6%)。水稻徒長病菌在土壤中 14 d 的存活數之平方根，與土壤 pH 值成顯著直線負相關 ($P < 0.05$)，與有效性鉀含量成顯著直線正相關 ($P < 0.05$)，與其他土壤性質則無直線相關。稻稈在土壤中 60 d 時，水稻徒長病菌存活率以彰化縣芬園鄉土壤最高 (2.5%)，其次為桃園縣觀音鄉土壤 (1.1%)，第 3 為屏東縣萬巒鄉土壤 (0.7%)。本試驗結果顯示，水稻徒長病菌在上述 3 種土壤中具有感染下一季水稻的潛在能力，因此建議在類似這 3 種土壤理化性質的地區，須特別留意本病害的發生與防治。

關鍵詞：水稻、水稻徒長病菌、稻稈、土壤性質。

前言

水稻徒長病最早於 1828 年在日本已有本病害記載 (Ito & Kimura 1931)，為水稻栽培區普遍存在之病害，此病害所造成的損失在危害嚴重的地區可減產 40–50% (Ou 1985)。水稻徒長病在台灣最早於 1912 年由澤田氏所記載報告，此病害又稱馬鹿苗病，在農民口中俗稱「稻公」。病害發生在水稻之苗期及分蘗盛期，罹病植株呈現徒長，罹病苗常比健康苗高出 1/3–1/2 以上，病苗纖細黃綠色，葉幅變小，葉片與葉鞘之著生角加大 (Chang 2003)。此病害主要由受汙染之稻種帶菌傳播，近年來農友雖有做稻種消毒，田間還是普遍發生，尤其以台東、花蓮地區最為嚴重。該地區主要種植品種「高雄 139 號」及「台梗 2 號」，田間罹病率超過 10% (Huang & Chu 2009)。除了稻種帶菌會傳播此病害外，稻稈帶菌亦是另一個感染途徑，為了防止此病害之擴大，有必要對此病原菌在稻稈上之殘存能力進行研究。

水稻徒長病菌在水田中可存活 4 mo (Mandal & Chaudhuri 1988)，如果兩期稻作相隔時間不長，土壤中的感染源可感染插秧後的健康稻苗。Yu & Sun (1977) 報告指出，土壤接種徒長病菌分生孢子，當每克土壤含 645 個菌體時，即可引起稻苗徒長病。Sunder & Satyavir

投稿日期：2015 年 2 月 28 日；接受日期：2015 年 7 月 30 日。
* 通訊作者：linmay@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所農業化學組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所農業化學組研究助理。台灣 台中市。
[3] 國立中興大學植物病理學系副教授。台灣 台中市。

(1998) 研究指出，於罹病田蒐集的稻稈在土壤中經過 5 mo 後，水稻徒長病菌之濃度仍高達 1,750 cfu g^{-1} soil，而在 10 mo 時還可檢測到病原菌。

以往稻稈大多焚燒後掩埋入土中，病原菌在稻稈焚燒過程中多數被殺死，但最近稻稈焚燒牽涉空氣污染之環保問題，故提倡稻稈直接掩埋至土中。如此一來，稻稈上之病原菌很容易藉由稻稈傳染至下一季水稻。台灣中部與南部地區兩期稻作相隔時間不長，土壤中的水稻徒長病菌可能會藉由稻稈感染插秧後的健康稻苗。稻稈上的水稻徒長病菌在土壤中的存活菌數，係稻稈能否引發水稻徒長病的關鍵因素 (Yu & Sun 1977)，而土壤性質是影響病原菌存活菌數的重要因子。有關土壤性質對水稻徒長病菌的影響之研究報導較少見，本文將探討土壤性質對水稻徒長病菌在稻稈上殘存能力之影響，以作為此病害防治之參考。

材料與方法

試驗土壤

選擇不同質地、母質與酸鹼值之土壤進行試驗，試驗土壤有 7 個，土壤採集地點、座標與地上植生如表 1。在土壤質地方面，選擇細質地土壤 (彰化縣竹塘鄉的粘板岩石灰性老沖積土，黏粒含量 23%，坋粒含量 48%，砂粒含量 29%，壤土) 與粗質地土壤 (彰化縣芳苑鄉的粘板岩石灰性老沖積土，黏粒含量 3%，坋粒含量 24%，砂粒含量 73%，砂質壤土) 各 1 個土壤。在母質方面，選擇紅壤、粘板岩沖積土與砂頁岩沖積土 3 種母質的土壤。紅壤為桃園縣觀音鄉的酸性土壤。粘板岩沖積土為屏東縣萬巒鄉的酸性土壤及彰化縣二林鎮的微鹼性土壤。砂頁岩沖積土為彰化縣芬園鄉的酸性土壤及台南市佳里區的微鹼性土壤。

土壤理化性質分析

採集上述試驗土壤，土壤樣品從田間採集後，風乾、磨碎、過篩，分析各項理化性質，包括土壤 pH 值 (酸鹼度)、EC 值 (電導度)、質地、有機質、有效性氮、磷、鉀、鈣、鎂、鐵、錳、銅、鋅與硼。土壤 pH 值與 EC 值的測定方法為水土重量比 1 : 1，以酸鹼度測定儀 (Suntex SP-701) 及電導度測定儀 (Denver Instrument Model 20) 檢測之。土壤質地以粒徑分析儀 (Beckman Coulter LS 13 320) 分析，有機質以總有機碳分析儀 (Elementarvario MAX C) 測定後換算為有機質含量。有效性氮先用 2MKCl 抽出後，以自動分析儀 (Astoria Analyzer Series 300) 測定。有效性磷、鉀、鈣、鎂、鐵、錳、銅、鋅、硼以 Mehlich-3 method 抽出後，以感應耦合電漿分析儀 (Inductively coupled plasma spectrometry, ICP, HORIBA JobinYvon ULTIMA 2C) 測定。

稻稈準備

稻稈為水稻品種「台農 71 號」，將乾燥之稻稈洗淨後，剪切成 2 cm 長，置於烘箱 (Yamato DK810) 80℃烘 48 h 後，放冷。稱取

表 1. 土壤採集處。
Table 1. Soil sampling sites.

No.	Sampling site	Coordinate N	Coordinate E	Cover plant
1	Chutang, Changhua County	23°51’24”	120°25’41”	Sweet potato
2	Fangyuan, Changhua County	23°56’55”	120°21’38”	Rice
3	Guanyin, Taoyuan County	25°00’39”	121°05’39”	Bamboo
4	Wanluan, Pingtung County	22°35’57”	120°35’13”	Weed
5	Erlin, Changhua County	23°53’44”	120°23’18”	Rice
6	Fenyuan, Changhua County	24°00’36”	120°39’35”	Weed
7	Chiali, Tainan County	23°11’01”	120°11’48”	Corn

0.5 g 稻稈，以鋁箔紙包好，放入 250 mL 燒杯中，經滅菌釜 (Yang Ta Min Instrument Co. YTM-B) 121℃，1.2 kg cm^{-2} 滅菌 20 min 後備用。

病原菌製備與菌落數計數

水稻徒長病菌由國立中興大學植物病理系提供，以 1/2 PDA 培養基在 26℃培養箱 (YIH DER LE-519) 中黑暗培養 7 d 作為病原菌來源。取滅菌後的稻稈，裝入直徑 5.5 cm 塑膠培養皿中，每皿放 0.5 g 稻稈。在稻稈上接種病原菌孢子懸浮液，每皿 5 mL，病原菌孢子濃度為 1.0 × 10^5 spores mL^{-1}。稻稈接種病原菌後，在 26℃培養箱中黑暗培養 7 d，作為病原菌之接種源，並測定稻稈中水稻徒長病菌接種時之菌落數，其測定方法如下：上述加病原菌孢子懸浮液培養 7 d 的稻稈，以鑷子夾取稻稈 (含 5 mL 菌液，0.5 g 稻稈體積約 1.6 mL) 放入裝有 95 mL 無菌水的 250 mL 三角瓶中，接著將三角瓶放在振盪培養箱 (YIH DER LM-510RD) 中，於 26℃轉速 150 rpm 振盪 1 h。振盪完後，取出三角瓶，此為稀釋倍數 10^{-1}，吸取 10^{-1} 稀釋液 10 mL 菌液，加入裝有 90 mL 無菌水的 250 mL 三角瓶中，此為稀釋倍數 10^{-2}。依上述方法稀釋至 10^{-5} 後，在稀釋倍數 10^{-3}、10^{-4}、10^{-5} 各取 0.1 mL 的菌液塗佈在孔雀綠瓊脂 (Malachite green agar) (Castellá *et al*. 1977) 培養基上，上述 3 個稀釋倍數各做 3 個培養皿 (直徑 9 cm)。接著將培養皿放在 26℃培養箱中黑暗培養 11 d，計數培養基上水稻徒長病菌的菌落數。選擇菌落數在 30–300 之間的稀釋倍數作為計算基準 (Wollum 1982)，計算水稻徒長病菌之菌落數。孔雀綠瓊脂培養基配方如下：1,000 mL 的純水中含 15 g Peptone (BD Co., USA)，1 g K_2HPO_4 (日本片山試藥株式會社試藥一級)，0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (日本片山試藥株式會社試藥一級)，20 g Agar (BD Co., USA)，2.5 mg malachite green oxalate (SIGMA-ALDRICH Co., USA)，0.1 g chloramphenicol (SIGMA-ALDRICH Co., USA)，0.05 g streptomycin sulfate (SIGMA-ALDRICH Co., USA)。

試驗處理

採集之試驗土壤有 7 個 (如表 1)，其中觀音鄉土壤母質為紅壤，加入矽酸鈣 (日本片山試藥株式會社試藥一級)，提高土壤 pH 值作為其對照，使試驗處理土壤為 8 個。矽酸鈣的添加量為每 50 g 土壤加 0.5 g $CaSiO_3$。每個土壤各秤取 50 g，各 4 重複，置於塑膠杯中。將已接種水稻徒長病菌並培養 7 d 之稻稈混入土壤中，稻稈與土壤比例為重量比 1:100，加水 20 mL，以鋁鉑紙封口，秤重，記錄總杯重，定期加水保持土壤水分含量。稻稈與土壤放在農業試驗所應用微生物實驗室室溫下培養，室溫溫度範圍為 24–28℃，在第 14、28、60、90、120 及 150 d 後從土壤中取出所有稻稈 (體積約 4 mL cup^{-1})。以鑷子夾取稻稈放入裝有 95 mL 無菌水的 250 mL 三角瓶中，接著將三角瓶放在振盪培養箱中，於 26℃轉速 150 rpm 振盪 1 h。振盪完後，取出三角瓶，此為稀釋倍數 10^{-1}，吸取 10^{-1} 稀釋液 10 mL 菌液，加入裝有 90 mL 無菌水的 250 mL 三角瓶中，此為稀釋倍數 10^{-2}。依上述方法稀釋至 10^{-4} 後，在稀釋倍數 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3} 及 10^{-4} 各取 0.1 mL 的菌液塗佈在孔雀綠瓊脂培養基上，上述 4 個稀釋倍數各做 3 個培養皿 (直徑 9 cm)。接著將培養皿放在 26℃培養箱中黑暗培養 11 d，計數培養基上水稻徒長病菌的菌落數，選擇每皿菌落數在 30–300 之間的稀釋倍數做為計算基準，計算水稻徒長病菌之菌落數。

pH 值與鉀含量對水稻徒長病菌生長之影響

不同 pH 值對水稻徒長病菌生長之影響： 取 100 mL 去離子水加入 250 mL 燒杯中，加 2.4 g 馬鈴薯葡萄糖 (Potato dextrose broth, BD Co., USA) 及 1.5 g Agar (BD Co., USA)，加熱使培養基溶解，以 1% HCl 及 1% KOH 將培養基 pH 值分別調整至 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 及 8.0。pH 值調整完後將培養基倒至 500 mL 三角瓶中，蓋上矽膠蓋，以兩層鋁箔紙封口，放入滅菌鍋中，以 121℃、1.2 kg cm^{-2} 滅菌 20 min。取出培養基放冷至 50–60℃時分裝至直徑 9 cm 培養皿中，每皿 15 mL，放冷，

備用。將水稻徒長病菌切成正方形0.5 cm × 0.5 cm 菌塊，放在培養基中央，每處理 4 重複。培養皿以石蠟膜封口，放入培養箱中 25℃黑暗培養 11 d，測量病菌生長最長直徑與最短直徑，計算其平均直徑。

不同鉀含量對水稻徒長病菌生長之影響： 在不同鉀含量試驗中，鉀離子之濃度為 0、60、125、250 及 500 mg kg^{-1}， 以 K_2SO_4 (聯工化學廠公司 EP 級 1 級) 為試藥。取 100 mL 去離子水加入 250 mL 燒杯中，加 1.2 g 馬鈴薯葡萄糖 (Potato dextrose broth, BD Co., USA)，並加入所需要的 K_2SO_4 試藥。攪拌溶解後，測量溶液之 pH 值。加 1.5 g Agar (BD Co., USA) 後，以兩層鋁箔紙封口，放入滅菌鍋中，以 121℃、1.2 kg cm^{-2} 滅菌 20 min。取出培養基放冷至 50–60℃時分裝至直徑 9 cm 培養皿中，每皿 15 mL，放冷備用。選擇水稻徒長病菌生長最外圈之菌絲作為接種源，以滅菌竹籤沾取病原菌少許，放在培養基正中央，每處理 6 重複。培養皿以石蠟膜封口，放入培養箱中 26℃黑暗培養 14 d，測量病菌生長最長直徑與最短直徑，計算其平均直徑。

相關性分析

水稻徒長病菌在稻稈上之存活菌落數與土壤理化性質是否有相關，需經相關性分析，當簡單相關性分析結果顯著，表示水稻徒長病菌在稻稈上之存活菌落數與土壤理化性質間存在直線相關。相關性分析可在 Excel 試算表管理軟體中進行。Excel 在「資料分析」裡提供了「相關係數」的計算，但不提供相關係數的顯著性測驗，不過可以透過輸入公式或函數來進行。相關係數 (r) 的顯著性測驗可利用 t 檢定 (Yu 1981)，公式如下：

$$|t| = \frac{|r|}{\sqrt{\dfrac{1-r^2}{n-2}}} > t_{(\alpha/2,\ n\text{-}2)}$$

式中 n 為樣本數，$t(\alpha/2, n\text{-}2)$ 為 α 顯著水準下自由度等於 n-2 的雙尾 t 臨界值。t 臨界值的計算，可利用 Excel 的 TINV 函數，其格式為：TINV (probability, degree_freedom)，probability 為雙尾機率值 (故若指定顯著水準為 0.05，只需直接輸入 0.05 即可，不必再除以 2)，而 degree_freedom 為自由度。Excel 的絕對值及開方根函數分別為 ABS 及 SQRT。將兩資料集的相關係數 (r) 與樣本數 (n) 帶入上述公式中計算 t 檢定的實測值。當 t 的實測值大於其臨界值，表示兩資料集存在顯著的直線相關關係。本文中病原菌菌落數先予開方根轉換 (square-root transformation)，再利用 Excel 的 CORREL 函數，計算病原菌菌落數開方根轉換後之數值與土壤理化性質之相關係數 (r)。得到相關係數後，利用上述公式與 Excel 的 TINV 函數，算出 t 檢定的實測值和臨界值，當 t 檢定的實測值大於 t 檢定的臨界值時，即表示病原菌菌落數開方根轉換後之數值與土壤理化性質存在有直線相關，反之，則表示兩資料集無直線相關。但無法認定兩資料集無任何關係或互相獨立，也有可能是其他二次以上的關係。

資料統計與分析

本文中水稻徒長病菌的存活率及在培養基上生長所量測的直徑，皆利用 SAS 套裝統計分析軟體先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，若處理效應顯著 ($P < 0.05$)，則再利用最小顯著性差異 (least significant difference; LSD) 測驗以比較各處理平均值間之差異性。

結果與討論

試驗土壤之理化性質分析

試驗土壤的理化性質如表 2 所示，細質地的竹塘土壤其黏粒含量比粗質地芳苑土壤多 20%，兩個土壤之 pH 值皆為微鹼性。竹塘土壤的有機質比較高 (3.7%)，但磷的有效性較低 (54 mg kg^{-1})，可能是因鈣的含量較高 (5,355 mg kg^{-1})，形成難溶性之磷酸化合物所致。母質為紅壤之觀音土壤，其有效性磷、鈣與鐵含量都很低，加入矽酸鈣後其土壤 pH 值由 6.0 上升至 6.5，有效性鈣含量亦明顯增加；萬巒鄉土壤與二林鎮土壤之母質皆為粘板岩沖積土，萬巒鄉土壤 pH 值為 4.3，二林鎮土壤 pH

表 2. 試驗前土壤之理化性質分析。

Table 2. The physical and chemical properties of tested soils before experiment.

Sampling site	pH (1 : 1)	EC (μS cm^{-1})	Clay (%)	OM (%)	N (mg kg^{-1})	P (mg kg^{-1})	K (mg kg^{-1})	Ca (mg kg^{-1})	Mg (mg kg^{-1})	Fe (mg kg^{-1})	Mn (mg kg^{-1})	Cu (mg kg^{-1})	Zn (mg kg^{-1})	B (mg kg^{-1})
Chutang	7.5	616	23	3.7	127	54	135	5,355	226	409	115	8.9	9.0	2.0
Fangyuan	7.6	319	3	1.5	4	164	189	3,483	167	373	127	6.1	9.4	1.0
Guanyin	6.0	169	28	1.2	21	1	230	446	159	50	24	0.8	1.6	0.3
Guanyin + $CaSiO_3$	6.5	373	28	1.2	16	2	205	1,911	147	65	26	1.0	2.0	0.3
Wanluan	4.3	408	30	2.4	93	511	344	555	178	543	28	1.5	3.9	0.2
Erlin	7.6	843	24	2.5	46	50	192	3,704	322	618	80	4.3	6.0	1.7
Fenyuan	5.1	319	25	2.3	59	156	219	939	155	656	6	0.8	4.5	0.3
Chiali	7.5	404	22	1.2	12	256	209	1,951	324	645	62	1.1	7.5	1.1

值為 7.6，兩者相差 3.3 unit。二林鎮土壤的有效性磷含量較低 (50 mg kg^{-1})，鈣的含量較高 (3,704 mg kg^{-1})，萬巒鄉土壤的有效性磷含量較高 (511 mg kg^{-1})，鈣含量較低 (555 mg kg^{-1})。芬園鄉土壤與佳里區土壤之母質皆為砂頁岩沖積土，芬園鄉土壤 pH 值為 5.1，佳里區土壤 pH 值為 7.5，兩者相差 2.4 unit。芬園鄉土壤的有效性鈣含量較低 (939 mg kg^{-1})，佳里區土壤的有效性鈣含量適中 (1,951 mg kg^{-1})。

不同處理時間對水稻徒長病菌在稻稈上存活菌落數之影響

稻稈接種病原菌培養 7 d 後，在 Malachite green agar 培養基上之菌落數為 1.0 × 10^7 cfu 0.5 g^{-1} of rice straw，此為稻稈在加入土壤時病原菌之初始濃度。稻稈在土壤中 14、28、60、90、120 及 150 d 後從土壤中取出，測定稻稈上病原菌的存活菌落數。由表 3 可知，稻稈上存活的病原菌菌落數在土壤中 14 d 時為 5.9 × 10^5–1.3 × 10^7 cfu 0.5 g^{-1} of rice straw，在土壤中 28 d 時為 5.6 × 10^4–2.0 × 10^6 cfu 0.5 g^{-1} of rice straw，在土壤中 60 d 時為 1.7 × 10^4–2.6 × 10^5 cfu 0.5 g^{-1} of rice straw，在土壤中 90 d 時為 1.7 × 10^3–3.6 × 10^4 cfu 0.5 g^{-1} of rice straw，在土壤中 120 d 時為 0–4.2 × 10^3 cfu 0.5 g^{-1} of rice straw，在土壤中 150 d 時為 0–3.3 × 10^3 cfu 0.5 g^{-1} of rice straw。

稻稈在土壤中 14 d 時，萬巒土壤的病原菌數最高 (1.3 × 10^7 cfu 0.5 g^{-1} of rice straw)，比原加入量高，觀音土壤的病原菌數次之 (5.6 × 10^6 cfu 0.5 g^{-1} of rice straw)，芬園土壤的病原菌數第 3 高 (4.2 × 10^6 cfu 0.5 g^{-1} of rice straw)，而二林土壤的病原菌數最低 (5.9 × 10^5 cfu 0.5 g^{-1} of rice straw)。稻稈在土壤中 28 d 後病原菌的菌落數隨時間增長而下降，以在二林土壤中的病原菌菌落數下降最快。Sunder & Satyavir (1998) 研究指出稻稈上的水稻徒長病菌在土壤中菌落數先增加後降低。病原菌菌落數比原加入時增加表示土壤環境適合病原菌生長，由稻稈與土壤中得到養分大量繁殖，當土壤與稻稈養分耗盡時，病原菌數量則逐漸降低。本研究所使用的萬巒鄉土壤與 Sunder & Satyavir (1998) 的研究結果相似。另外，Sunder & Satyavir (1998) 的研究指出，稻稈在土壤中 14 mo 後完全分解，而在 10 mo 時還可檢測到水稻徒長病菌。本研究所使用之觀音鄉紅壤在 4 mo 後已檢測不到病原菌，而二林鎮土壤在 5 mo 後亦檢測不到病原菌。除了土壤種類可影響病原菌在稻稈的存活時間外，土壤水分亦會影響病原菌在稻稈的存活時間，根據 Mandal & Chaudhuri (1988) 研究指出，水稻徒長病菌適合在土壤水分 12–36% 生長，而在低含水量 (4.8%) 與高含水量 (48%) 下，水稻徒長病菌在土壤中存活菌落數下降速度較快。Sunder & Satyavir (1998) 試驗中土壤之含水量為 15.2%，適合病原菌生長，而本文試驗土壤保持水分含量為 50%，水分含量較高，對病原菌生長較不利，所以病原菌在稻稈存活的時間較短。

稻稈在土壤中 60 d 時，水稻徒長病菌菌

表 3. 不同土壤中水稻徒長病原菌在稻稈上不同期間之菌落數。

Table 3. The pathogen survival counts of bakanae disease inoculated in rice straws under different incubation periods in different soils.

	Mean colony forming unit (cfu) per 0.5 g of straw							
Days after incubation	Chutang	Fangyuan	Guanyin	Guanyin + $CaSiO_3$	Wanluan	Erlin	Fenyuan	Chiali
0	1.0 × 10^7	1.0 × 10^7	1.0 × 10^7	1.0 × 10^7	1.0 × 10^7	1.0 × 10^7	1.0 × 10^7	1.0 × 10^7
14	3.9 × 10^6	1.2 × 10^6	5.6 × 10^6	3.0 × 10^6	1.3 × 10^7	5.9 × 10^5	4.2 × 10^6	2.1 × 10^6
28	1.9 × 10^5	5.6 × 10^4	6.0 × 10^5	3.4 × 10^5	5.9 × 10^5	3.2 × 10^5	2.0 × 10^6	1.9 × 10^5
60	5.6 × 10^4	4.4 × 10^4	1.1 × 10^5	5.6 × 10^4	7.8 × 10^4	1.7 × 10^4	2.6 × 10^5	2.1 × 10^4
90	1.4 × 10^4	1.7 × 10^3	2.5 × 10^3	3.3 × 10^3	4.2 × 10^3	1.7 × 10^3	3.6 × 10^4	7.5 × 10^3
120	4.2 × 10^3	3.3 × 10^3	0	0	3.3 × 10^3	8.0 × 10^2	2.5 × 10^3	1.7 × 10^3
150	3.3 × 10^3	2.3 × 10^2	0	0	1.7 × 10^2	0	2.5 × 10^2	1.7 × 10^2

落數以彰化縣芬園鄉土壤最高 (2.6×10^5 cfu 0.5 g^{-1} of rice straw)，其次為桃園縣觀音鄉土壤 (1.1×10^5 cfu 0.5 g^{-1} of rice straw)，第 3 為屏東縣萬巒鄉土壤 (7.8×10^4 cfu 0.5 g^{-1} of rice straw)，最低為彰化縣二林鎮土壤 (1.7×10^4 cfu 0.5 g^{-1} of rice straw) 與台南市佳里區土壤 (2.1×10^4 cfu 0.5 g^{-1} of rice straw)。0.5 g 稻稈乃埋在 50 g 土壤中，若以每 g 土壤為計數單位，水稻徒長病菌初始濃度 1.0×10^7 cfu 0.5 g^{-1} of rice straw 50 g^{-1} of soil，平均每公克土壤含量為 2.0×10^5 cfu。而彰化縣芬園鄉土壤、桃園縣觀音鄉土壤與屏東縣萬巒鄉土壤，這 3 個土壤在水分含量 50% 經過 2 mo 後，平均每公克土壤中的水稻徒長病菌菌落數仍在 1,500 cfu 以上。依據 Yu & Sun (1977) 報告指出，當每公克土壤含 645 個菌體時，即可引起稻苗徒長病。由上述結果可知，當土壤中水稻徒長病菌菌落數在 2.0×10^5 cfu g^{-1} soil 以上，且水稻兩期作相隔 2 mo 時，則彰化縣芬園鄉土壤、桃園縣觀音鄉土壤與屏東縣萬巒鄉土壤，這 3 個土壤有可能引發秧苗之徒長病。

土壤性質對水稻徒長病菌在稻稈上存活率之影響

水稻徒長病菌存活率因土壤種類不同而有明顯差異，如表 4 所示。稻稈在土壤中 14 d 時，水稻徒長病菌其存活率以屏東縣萬巒鄉土壤最高 (126%)，其母質為非石灰性粘板岩沖積土，土壤 pH 值為 4.3。其次為桃園縣觀音鄉土壤 (53%)，其母質為紅壤，土壤 pH 值為 6.0。第 3 為彰化縣芬園鄉土壤 (41%)，其母質為非石灰性砂頁岩沖積土，土壤 pH 值為 5.1。水稻徒長病菌存活率最低為彰化縣二林鎮土壤 (6%) 與彰化縣芳苑鄉土壤 (12%)，其母質皆為石灰性粘板岩沖積土，其土壤 pH 值皆為 7.6。稻稈在土壤中 14 d 時，細質地的竹塘鄉土壤病原菌存活率 (37%) 比粗質地的芳苑鄉土壤病原菌存活率高 25%；母質為紅壤之觀音鄉酸性土壤病原菌存活率 (53%) 比添加 $CaSiO_3$ 的觀音鄉土壤高 24%；母質為粘板岩沖積土的萬巒鄉酸性土壤病原菌存活率 (126%) 比相同母質但含石灰質之二林鎮微鹼性土壤高 120%；母質為砂頁岩沖積土的芬園鄉酸性土壤病原菌存活率 (41%) 比相同母質但含石灰質之佳里區微鹼性土壤高 21%。

水稻徒長病菌在稻稈上的存活數與土壤性質之相關性分析

水稻徒長病菌在稻稈上的存活數與土壤性質之相關性分析，如表 5。稻稈上病原菌存活數非常態分布，須先經開方根轉換後再與土壤性質進行相關性分析，由表 5 可知水稻徒長病菌在稻稈上的存活數之平方根與土壤 pH 值、EC 值、質地、有機質、有效性氮含量、有效性磷含量、有效性鉀含量、有效性鈣含量、有效性鎂含量、有效性鐵含量、有效性錳含量、有效性銅含量及有效性鋅含量與有效性硼含量之相關係數，分別為 -0.858、-0.409、0.562、0.150、0.491、0.593、0.755、-0.577、-0.485、-0.104、-0.535、-0.334、-0.463 及 -0.575。在 Excel 軟體中輸入公式或函數計算出 *t* 檢定的實測值和臨界值，由表 5 中可知，土壤 pH 值與有效性鉀含量之 *t* 檢定的實測值大於臨界值，表示土壤 pH 值、有效性鉀含量

表 4. 不同土壤中水稻徒長病原菌在稻稈上不同期間之存活率。

Table 4. The pathogen survival rates of bakanae disease inoculated in rice straws under different incubation periods in different soils.

	Survival rate of pathogen (%)							
Days after incubation	Chutang	Fangyuan	Guanyin	Guanyin + $CaSiO_3$	Wanluan	Erlin	Fenyuan	Chiali
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
14	37.0 bc[z]	12.0 e	53.0 b	29.0 cd	126.0 a	6.0 e	41.0 bc	20.0 de
28	1.8 cd	0.5 d	5.8 b	3.3 c	5.7 b	3.1 c	19.3 a	1.8 cd
60	0.5 cd	0.4 cde	1.1 b	0.5 cd	0.7 bc	0.2 e	1.8 a	0.2 de

[z] Means within each raw followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher's protected LSD test.

表 5. 土壤性質與水稻徒長病菌在稻稈上 14 天的存活數之相關性分析。

Table 5. Correlation analysis between soil properties and the pathogen survival counts of bakanae disease after 14 d incubation in rice straws.

Sampling site	Concentration of pathogen (cfu 0.5 g^{-1} of rice straw)	Square-root of concentration of pathogen	pH (1 : 1)	EC ($\mu S\ cm^{-1}$)	Clay (%)	OM (%)	N ($mg\ kg^{-1}$)	P ($mg\ kg^{-1}$)	K ($mg\ kg^{-1}$)	Ca ($mg\ kg^{-1}$)	Mg ($mg\ kg^{-1}$)	Fe ($mg\ kg^{-1}$)	Mn ($mg\ kg^{-1}$)	Cu ($mg\ kg^{-1}$)	Zn ($mg\ kg^{-1}$)	B ($mg\ kg^{-1}$)
Chutang	3.9×10^6	1,975	7.5	616	23	3.7	127	54	135	5,355	226	409	115	8.9	9.0	2.0
Fangyuan	1.2×10^6	1,095	7.6	319	3	1.5	4	164	189	3,483	167	373	127	6.1	9.4	1.0
Guanyin	5.6×10^6	2,366	6.0	169	28	1.2	21	1	230	446	159	50	24	0.8	1.6	0.3
Guanyin + $CaSiO_3$	3.0×10^6	1,732	6.5	373	28	1.2	16	2	205	1,911	147	65	26	1.0	2.0	0.3
Wanluan	1.3×10^7	3,606	4.3	408	30	2.4	93	511	344	555	178	543	28	1.5	3.9	0.2
Erlin	5.9×10^5	768	7.6	843	24	2.5	46	50	192	3,704	322	618	80	4.3	6.0	1.7
Fenyuan	4.2×10^6	2,049	5.1	319	25	2.3	59	156	219	939	155	656	6	0.8	4.5	0.3
Chiali	2.1×10^6	1,449	7.5	404	22	1.2	12	256	209	1,951	324	645	62	1.1	7.5	1.1
Correlation coefficient (r)[z]			-0.858	-0.409	0.562	0.150	0.491	0.593	0.755	-0.577	-0.485	-0.104	-0.535	-0.334	-0.463	-0.575
t-test measured values (t_m)[y]			4.097*	1.099	1.666	0.370	1.381	1.803	2.820*	1.729	1.357	0.256	1.550	0.868	1.280	1.719
t-test critical values [$t(\alpha/2, n\text{-}2)$][x]			2.447	2.447	2.447	2.447	2.447	2.447	2.447	2.447	2.447	2.447	2.447	2.447	2.447	2.447

[z] Correlation coefficients (r) were analyzed from the concentrations of pathogen and soil properties. The concentrations of pathogen were square-root transformed prior to analysis.

[y] t-test measured values (t_m) = ABS(r)/SQRT[(1-r^2)/(n-2)]. 'r' is the correlation coefficient, 'n' is the sample number, 'ABS' and 'SQRT' are the statistical functions in Excel software.

[x] t-test critical values [$t(\alpha/2, n\text{-}2)$] = TINV (probability, degree_freedom), '$\alpha/2$' is the two-tailed probability, 'n-2' is the degree of freedom, 'TINV' is the statistical function in Excel software, 'degree_freedom' is the degree of freedom.

* $t_m > t(\alpha/2, n\text{-}2)$, At probability = 0.05, n-2 = 6.

與水稻徒長病菌存活數的平方根有直線相關，土壤 pH 值與水稻徒長病菌存活數的平方根之相關係數為負數，所以兩者為直線負相關，表示在高 pH 值的土壤中其水稻徒長病菌存活數較低；有效性鉀含量與水稻徒長病菌存活數的平方根之相關係數為正數，所以兩者為直線正相關，表示在高有效性鉀含量的土壤中其水稻徒長病菌存活數較高。有關 pH 值與有效性鉀含量是否為造成水稻徒長病菌存活數多寡之主要原因，抑或是其他變數所引起的間接影響，需要進一步測試。本文下一部分將探討 pH 值與鉀含量對水稻徒長病菌生長之影響。

pH 值與鉀含量對水稻徒長病菌生長之影響

在不同 pH 值對水稻徒長病菌生長之影響試驗中，不同 pH 值處理為 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 及 8.0 等 7 個 pH 值，上述各處理培養皿在培養箱中 25℃黑暗培養 11 d 後，其病原菌直徑分別為 4.3 cm ± 0.1 cm、5.0 cm ± 0.0 cm、5.2 cm ± 0.1 cm、6.1 cm ± 0.3 cm、6.2 cm ± 0.2 cm、6.3 cm ± 0.3 cm、6.6 cm ± 0.2 cm。以 pH 8.0 處理之水稻徒長病菌菌落直徑最大，明顯比病原菌在 pH 5.0–7.0 之生長好 ($P < 0.05$)，病原菌菌落直徑最小為 pH 5.0。由上述結果可知，水稻徒長病菌在高 pH 值的培養基上生長較好。

在不同鉀含量對水稻徒長病菌生長之影響試驗中，不同鉀添加量處理為 0、60、125、250 及 500 mg kg^{-1}，鉀添加後其溶液 pH 值分別為 4.9 ± 0.1、5.0 ± 0.0、4.9 ± 0.1、4.9 ± 0.0 及 5.0 ± 0.0，K_2SO_4 添加對溶液 pH 值無明顯影響。上述各處理培養皿在培養箱 26℃中培養 14 d，測量病原菌生長之直徑，隨著鉀添加量增加，病原菌直徑依序為 5.5 cm ± 0.3 cm、6.2 cm ± 0.5 cm、5.9 cm ± 0.2 cm、6.1 cm ± 0.2 cm 及 6.3 cm ± 0.3 cm。培養基中添加鉀 60–500 mg kg^{-1} 可明顯促進水稻徒長病菌之生長 ($P < 0.05$)，而鉀添加量 60、125、250 及 500 mg kg^{-1} 等 4 處理間的水稻徒長病菌之生長無明顯差異 ($P > 0.05$)。這表示 1/2 PDA 培養基添加鉀 60 mg kg^{-1} 後，鉀含量已不是水稻徒長病菌生長之限制因子。

綜合上述結果可知，水稻徒長病菌在高 pH 值的 PDA 培養基上生長較好，在 1/2 PDA 培養基中添加鉀 60 mg kg^{-1} 可促進水稻徒長病菌之生長。但超過 60 mg kg^{-1} 後，對病原菌在培養基上生長無明顯影響。此結果與本文中稻稈上的水稻徒長病菌在高 pH 值的土壤中存活數較低，在高鉀含量的土壤中存活數較高之結果不同。這說明土壤中有其他因子影響水稻徒長病菌的存活數，土壤 pH 值與鉀含量的影響是間接的關係。Alabouvette (1986) 研究指出抑病土壤可降低作物土壤傳播性病害之嚴重程度，即使是在土壤中含有很高的病原菌接種密度，他認為土壤的抑病能力是由於微生物間的養分競爭。本文中水稻徒長病菌在高 pH 值的土壤中存活數較低，這可能是因高 pH 值下細菌與放線菌數量較低 pH 值時多 (Guo 1985)，與水稻徒長病菌養分競爭，造成病原菌存活數下降。微生物的養分競爭是否為造成病原菌存活數下降之主要原因，尚需進一步研究來確認。

引用文獻

Alabouvette, C. 1986. Fusarium-wilt suppressive soils from the Châteaurenard region: Review of a 10-year study. Agronomie 6:273–284.

Castellá, G., M. R. Bragulat, M. V. Rubiales, and F. J. Cabañes. 1997. Malachite green agar, a new selective medium for *Fusarium* spp. Mycopathologia 137:173–178.

Chang, Y. C. 2003. Bakanae disease of rice. p.256–262. *in*: Monograph of Plant Protection Ser. 8: Plant Protection of Rice. (Zou, H. J. and J. P. Shi, eds.) Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Executive Yuan. Taipei, Taiwan. 448 pp. (in Chinese)

Guo, K. S. 1985. Soil organisms. p.105–126. *in*: Soil Science. (Guo, K. S., ed.) Tzi-Yi Press. Taipei, Taiwan. 801 pp. (in Chinese)

Huang, T. C. and S. C. Chu. 2009. The occurrence and control of rice bakanae disease in Taiwan. p.29–43. *in*: Proceedings of Symposium on Achievements and Perspectives of Rice Protection in Taiwan. July 9, 2009. Chiayi, Taiwan. Chiayi Agricultural Experiment Station, TARI. Chiayi, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Ito, S. and J. Kimura. 1931. Studies on the 'bakanae' disease of the rice plant. Rep. Hokkaido Agric. Exp. Stn. 27:1–95.

Mandal, D. N. and S. Chaudhuri. 1988. Survivability of *Fusarium moniliforme* Sheld under different moisture regimes and soil conditions. Intl. J. Tropical Plant Dis. 6:201–206.

Ou, S. H. 1985. Rice Diseases. 2nd ed. Commonwealth Mycological Institute Press. Kew. 380 pp.

Sunder, S. and Satyavir. 1998. Survival of *Fusarium moniliforme* in soil, grains and straws of paddy. Indian Phytopathol. 51:47–50.

Wollum, A. G., II. 1982. Culture methods for soil microorganisms. p.781–802. *in*: Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties. (Page, A. L., R. H. Miller, and D. R. Keeney, eds.) American Society of Agronomy. Madison, WI. 1159 pp.

Yu, C. H. 1981. Applied Statistics. Chao-Jen Pub. Taichung. 516 pp. (in Chinese)

Yu, K. S. and S. K. Sun. 1977. Studies on inoculum potential and incubation period of rice bakanae disease. Plant Prot. Bull. 19:245–250. (in Chinese with English abstract)

Epidemical Study of *Fusarium fujikuroi* by Rice Straws

Su-Chen Lin[1,*], Chun-Yu Zheng[2], Chao-Yi Wang[2], Zong-Zhe Wu[2], and Chi-Yu Chen[3]

Abstract

Lin, S. C., C. Y. Zheng, C. Y. Wang, Z. Z. Wu, and C. Y. Chen. 2016. Epidemical study of *Fusarium fujikuroi* by rice straws. J. Taiwan Agric. Res. 65(1):92–102.

In recent years, the bakanae disease of rice caused by *Fusarium fujikuroi* seems getting serious in Taiwan. In order to evaluate the infectiousness of rice straws on this disease development, various soil types were chosen to study the survival capability of the pathogen on rice straws. These results will be referred as measures in the disease control. This study was conducted in the laboratory of Taiwan Agricultural Research Institute. The pathogen of bakanae disease was provided by the Department of Plant Pathology of Nation Chung Hsing University. The straws of the rice cultivar 'TNG71' were used. The experiment was conducted in April, 2013. The pathogen was inoculated in the rice straws and incubated for 7 days as initial inoculum.The mixing ratio between straw and soil was 1:100 (w/w) and the initial concentration of inoculum was 2.0×10^5 cfu g^{-1} soil. The straw samples were retrieved from the tested soils after 14, 28, 60, 90, 120 and 150 days incubation, respectively. The survival rates of pathogen were determined by serial dilution plate method. The result indicated that after 14 days incubation, the highest survival rate of pathogen was in Wanluan soil, Pingtung County (126%), followed by Guanyin soil, Taoyuang County (53%) and Fengyuang soil, Changhua County (41%).The lowest one was found in Erlin soil, Changhua County (6%). It showed that the square root of bakanae pathogen survival counts after 14 days incubation were strongly negatively linear-correlated with soils pH ($P < 0.05$), strongly positively linear-correlated with available potassium concentrations (P < 0.05), and none-linear correlated with other soil properties. After 60 days incubation, the first three soil samples containing higher survival rate of the pathogen were from Fengyuang, Changhua County (2.5%), Guanyin, Taoyuang County (1.1%), and Wanluan, Pintong County (0.7%), respectively. Due to the long persistence (60 days) in these three types of soils, the pathogen was considered with the capability of infecting the following rice crop and the soil types were conducive to bakanae disease. Thus, we recommended that precaution on the occurrence and prevention of bakanae disease should be taken in these areas.

Key words: Rice, *Fusarium fujikuroi*, Rice straw, Soil properties.

Received: February 28, 2015; Accepted: July 30, 2015.
[*] Corresponding author, e-mail: linmay@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agriculture Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Research Assistants, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agriculture Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Associate Professor, Department of Plant Pathology, Nation Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 65(1):103–108 (2016)
DOI: 10.6156/JTAR/2016.06501.10 研究簡報

台灣山葵上發生的山葵斑駁病毒之鑑定

鄧汀欽[1,*] 蔡錦慧[2] 寧方俞[3]

摘要

鄧汀欽、蔡錦慧、寧方俞。2016。台灣山葵上發生的山葵斑駁病毒之鑑定。台灣農業研究 65(1):103–108。

2012 年 4 月自嘉義縣阿里山鄉採集山葵植株，以葉片汁液進行接種試驗，在奎藜 (*Chenopodiumquinoa*) 葉片形成局部病斑，經單斑分離得病毒純系。經酶聯抗體免疫分析 (ELISA) 及西方轉漬反應 (Western blot)，這些分離株與番茄嵌紋病毒 (*Tomato mosaic virus*; ToMV) 抗體有交互反應 (cross reaction)。接種試驗結果顯示，其寄主範圍主要在十字花科植物，但不感染油菜及初秋甘藍。取其全量 RNA，以 *Tobamovirus* 廣效性引子對 TMVmpf 及 TMV3nr 進行反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR)，結果得到一個 688 bp 的片段。此片段為病毒的部分鞘蛋白 (CP) 及部分移動蛋白 (MP) 的基因，經解序後與 GenBank 中核苷酸序列比對，結果與山葵斑駁病毒栃木分離株 (*Wasabi mottle virus* Tochigi isolate, Acc. No. AB017504) 的對應片段，相同度達 99%。親緣分析結果，則顯示其 CP 基因的產物與 Acc No. BAA28951 (a wasabi strain of crucifer *Tobamovirus*) 的對應片段之相同度為 99.3%，但與 ToMV 昆士蘭分離株 (Acc No. NP_78449) 的相同度僅 49%，因此鑑定這些山葵分離株即是山葵斑駁病毒 (WMoV)。利用 ELISA 檢測阿里山區的山葵植株，共調查 187 個樣本，其中有 66 個呈陽性反應，進一步核酸分析鑑定亦皆為 WMoV。本報告雖是台灣 WMoV 的首發紀錄，但 WMoV 應早已存在於阿里山區。

關鍵詞：菸草嵌紋病毒屬、阿里山、番茄嵌紋病毒、十字花科。

前言

山葵 (wasabi) 的根、莖、葉都可以食用，是原產於日本的多年生草本植物，學名為 *Wasabia japonica* (Miq.) Matsumura，屬於十字花科 (Brassicaceae)。一般食用肥厚短縮的莖部，需種植 18–24 mo 才能收成。生長適溫約 13–8℃，夏季溫度不能過高，適合種植於谷地或流動水邊。台灣在 1914 年自日本引進種植於阿里山區，利用天然森林的林間，以旱地栽培方式種植。山葵的產值高，市場需求率也很高，1997 年台灣栽培面積曾達 600 ha。近年雖有實生苗或試管苗生產，但傳統栽種方式大多以莖節長出的分株芽 (offshoot) 行無性繁殖。以往台灣無山葵病毒病的紀錄，業者也未注意種苗帶病毒的問題，近來田間疑似病毒感染的現象已逐漸浮現且蔓延至各栽培區域，本報告進行台灣山葵病毒病調查與鑑定，提供作為防治之基礎。

病毒來源

病毒來源是在 2012 年 4 月從嘉義縣阿里山鄉採集的山葵植株，具明顯黃化嵌紋及皺葉之病徵 (圖 1A)，加入 10 倍 (W/V) 體積之 0.1 M 磷酸鈉緩衝液 (pH 7.4) 研磨葉片，以汁液磨擦接種於灑有 400 mesh 金鋼砂之奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 葉片。於接種後

投稿日期：2015 年 6 月 9 日。接受日期：2015 年 7 月 10 日。
* 通訊作者：tcde@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。
[3] 農委會茶業改良場茶作課助理研究員。台灣 桃園縣。

3–5 d 即出現局部病斑 (圖 1B)，經過 3 次挑單斑分離得到單斑純系病毒株，作為後續試驗之病毒接種源。

寄主範圍試驗

寄主範圍試驗的結果，顯示山葵病毒分離株接種十字花科 (Brassicaceae) 植物，可以感染青江菜及切葉小白菜 (*Brassica rapa* L. *chinensis*)、包心白菜 (*B. rapa* L. *pekinensis*)、包心芥菜 (*Brassica juncea* var. *foliosa* Bailey.)、芥菜心 (*Brassica juncea* var. *tsatsai* Mao)、結球甘藍 (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*)、乳酪花椰菜 (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*)、蘿蔔 (*Raphanus sativus* L.)、胡椒草 (*Lepidium sativum* L.) 等，但不感染油菜 (*Brassica napus* L.) 及初秋甘藍 (*Brassica oleracea* var. *capitata* cv. Chu-chiu)。接種茄科 (Solanaceae) 植物，可以系統性感染香瓜茄 (*Solanum muricatum* Ait.)、「嬌娘」茄 (*Solanum melongena* L. cv. Charming) 及圓葉菸 (*Nicotiana benthamiana* Domin) 與 *Nicotiana debneyii* Domin 兩種菸草，局部感染「昭君」茄 (*Solanum melongena* L. cv. Fullness) 及心葉菸 (*Nicotiana glutinosa* L.) (圖 1C)、白肋菸 (*Nicotiana tabacum* L. cv. White Burley)；不感染「萬國士」菸草、「喜綠」茄、4 種番椒 (*Capsicum* spp. L.) (朝天椒、咖啡椒、鬼椒、朱姬甜椒) 及 8 種番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) (「鐵娘」、「新光」、「春光」、「美女」、「秀女」、

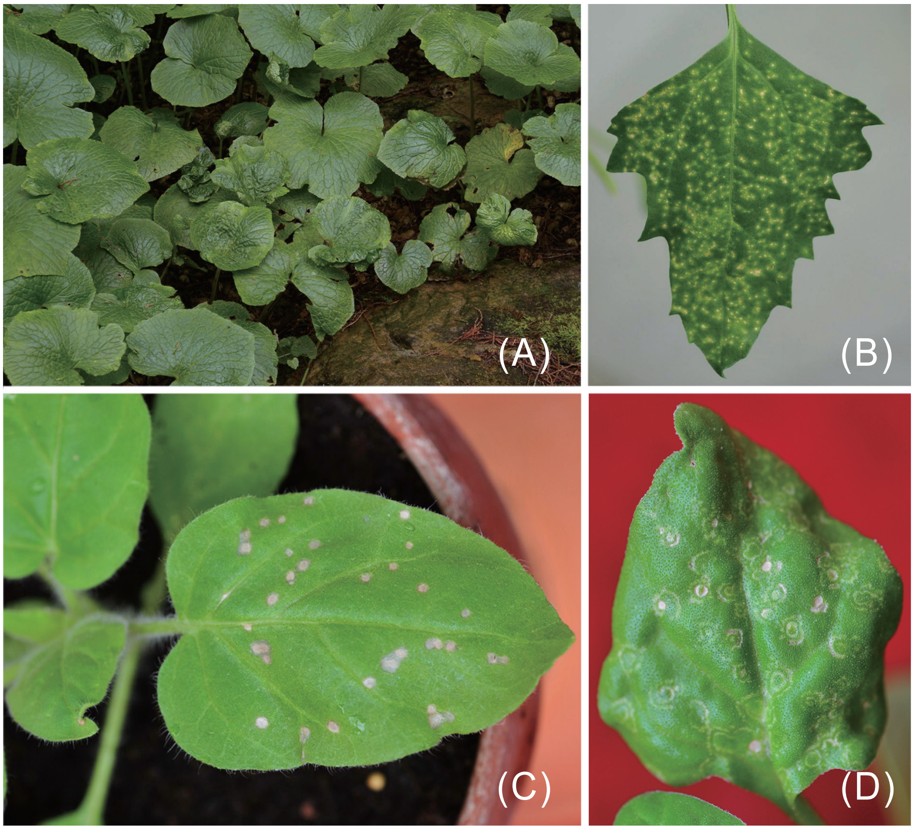


圖 1. 阿里山鄉山葵植株具明顯黃化嵌紋及皺葉之病徵 (A)；山葵病毒接種後出現典型局部病斑：奎藜 (*Chenopodium quinoa*) (B) *Nicotianaglutinosa* (C) 及番杏 (*Tetragoniatetragonioides*) (D)。

Fig. 1. Rugose and yellow mosaic symptoms of wasabi plants grown in Alishan area (A). Typical local lesions appeared on leaves after inoculation of wasabi virus isolate to plants of *Chenopodium quinoa* (B), *Nicotiana glutinosa* (C), and *Tetragonia tetragonioides* (D).

「金瑩」、「金玉」、「一點紅」)。此外，山葵病毒分離株對千日紅 (*Gomphrena globosa* L.) 及番杏 [*Tetragonia tetragonioides* (Pall.) O. Kuntze] (圖 1D) 都有 tobamovirus 典型的局部壞疽病斑，但如上所述，對茄科植物的致病性則明顯異於番茄嵌紋病毒 (*Tomato mosaic virus*; ToMV) (Deng *et al*. 2012)。以上所有寄主範圍試驗的病毒感染，都再經酶聯抗體免疫分析 (ELISA) (Clark & Adams 1977) 確認。

血清學反應

血清學反應的抗體引用先前報告的 ToMV 抗血清 (Deng *et al*. 2012)，純化其免疫球蛋白 (IgG) 進行酶聯抗體免疫分析 (ELISA) (Clark & Adams 1977) 及西方轉漬分析 (Western blot) (Towbin *et al*. 1979)。抗原則取接種保存於奎藜葉片之病毒株包括：ToMV 香瓜茄分離株 (ToMV-Pepino)、CY00343 番茄種傳分離株 (ToMV-Tomato seed trans.)、山葵-1 分離株、山葵-4 分離株、山葵-22 分離株及健康奎藜對照組，ELISA 反應值及西方轉漬結果如圖 2 所示，3 株山葵病毒分離株與 ToMV 抗體都有交互反應 (cross reaction)。

核酸定序與親緣分析

取 100 mg 各病毒株的葉組織，以純化試劑組 (Plant Total RNA Extraction Miniprep System; Viogene, CA, US) 萃取病毒全量 RNA。應用 *Tobamovirus* 廣效性引子對 TMVmpf (5'-AGTTGTTGATGAGTTCATGGA-3')/TMV3nr (5'-CAACCCTTCGATTTAAGTGGA-3') (Huang *et al*. 2004)，及反轉錄-聚合酶連鎖反應試劑 (AccuPowerRT/PCR Premix; Bioneer, Daejeon, Korea) 進行反轉錄-聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR)，於 MultiGene TC-9600 Thermo Cycler (Labnet, Edison, NJ, US) 中進行增幅反應，反應條件如下：先於 70℃反應 5 min，10℃反應 10 min，42℃反應 60 min，94℃反應 2 min，之後再進行94℃ 30 s，55 s，70℃ 60 s，共 35 個循環，最後 1 個循環為 70℃下聚合延伸 10 min。反應結果的 DNA 產物以電泳進行分析，ToMV 可增幅出 800 bp 之核酸片段，但所有山葵分離株都僅得到 1 個 688 bp 的片段 (圖 3)。由 3 個山葵分離株 RT-PCR 增幅所得之 DNA 片段，以小量膠體 DNA 回收組 (Gel Advanced Extraction Miniprep System; Viogene, CA, US) 回收及純化，再以 yT&A

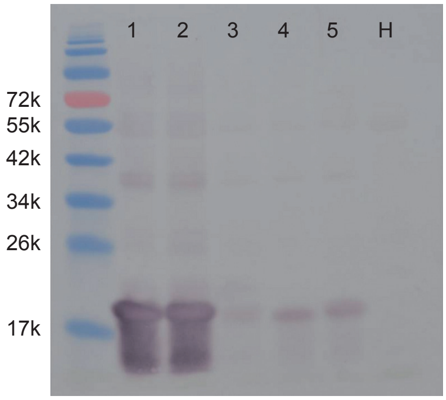


圖 2. 以 ToMV 抗體進行酶聯抗體免疫分析及西方轉漬分析之結果。行 1：香瓜茄分離株 (ELISA 反應值 1.478)；行 2：CY00343 番茄種傳分離株 (ELISA 反應值 2.027)；行 3：山葵-1 分離株 (ELISA 反應值 0.234)；行 4：山葵-4 分離株 (ELISA 反應值 0.417)；行 5：山葵-22 分離株 (ELISA 反應值 0.554)；行 H：健康對照組 (ELISA 反應值 0.085)。

Fig. 2. Results of serological reactions of ELISA and Western blot using antibody to ToMV. Lane 1: ToMV-Pepino (ELISA value 1.478); Lane 2: ToMV-Tomato seed trans (ELISA value 2.027); Lane 3: Wasabi-1 (ELISA value 0.234); Lane 4: Wasabi-4 (ELISA value 0.417); Lane 5: Wasbi-22 (ELISA value 0.554); and Lane H: Healthy CK (ELISA value 0.085).

載體及 ECOS101 勝任細胞 (competent cell) (Yeastern Biotech，台北) 進行選殖，委由明欣生物科技公司 (台北) 進行核苷酸序列分析。

將山葵病毒分離株定序片段 (部分 CP 基因 + 部分 MP 基因) 的序列與 Genebank 上已登錄其他 *Tobamoviruses* 之對應基因核苷酸序列進行比對，利用 ClustalX2 (http://www.clustal.org/) 進行 alignment，結果顯示山葵分離株的基因對應片段與山葵斑駁病毒栃木分離株 (*Wasabi mottle virus* Tochigi isolate, Acc No. AB017504) (Shimamoto *et al*. 1998) 的相同度最高達 99%。再以 MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (http://www.megasoftware.net/) 之 Neighborhood-joining 以 CP 基因的胺基酸產物作成親緣關係樹狀圖，如圖 4 所示山葵分離株 4 (Alishan wasabi 120525-4) 與山葵分離株 1 (Alishan wasabi 1) 及山葵分離株 22 (Alishan wasabi120530-22) 比對，相似度約 97–99%，與 Acc No. BAA28951 (a wasabi strain of crucifer *Tobamovirus*) (Shimamoto *et al*. 1998) 的對應片段之相似度為 99.3%，但與澳洲昆士蘭 ToMV 分離株 (Acc No. NP_078449) 的相同度僅 49%。因此，這些山葵病毒分離株均鑑定屬於山葵斑駁病毒 (*Wasabi mottle virus*; WMoV)。WMoV 的分類地位屬於 *Tobamovirus* 屬 *Virgaviridae* 科，在 2005 年已經由 ICTV (8th Report) 正式核定。

病毒發生調查

病毒發生調查共採集阿里山區的山葵植株 187 個樣本，利用 ELISA 檢測，其中有 66 個樣本與 ToMV 抗體呈陽性反應，進一步核酸分析鑑定亦皆為 WMoV。WMoV 雖如同 TMV 或 ToMV 可感染 *Nicotiana* 屬植物，且對 *N. glutinosa*、千日紅及番杏都有 *Tobamovirus* 典型的局部壞疽病斑，但對茄科植物的致病性明顯低於 ToMV，尤其是對所有供試番茄品種都無致病力，因此對茄科作物生產與採種作業的影響較小。WMoV 與 TMV 或 ToMV 有血清交互反應關係，且判別寄主的反應類似，因此在有核酸分析工具前，日本 (Oshima *et al*. 1971; Oshima *et al*. 1974; Kashiwazaki *et al*. 1990; Takahashi & Shohara, 1990) 及韓國 (Kim & Lee 1999) 往年所報告的 TMV wasabi

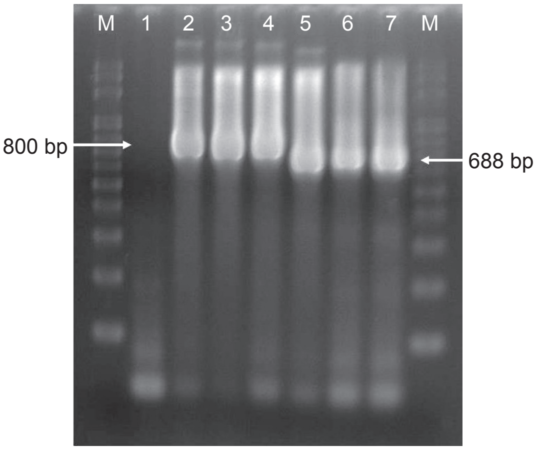


圖 3. 以引子對 TMVmpf 及 TMV3nr 進行反轉錄-聚合酶鏈鎖反應之結果。行 1：健康對照組；行 2：ToMV 香瓜茄分離株；行 3：ToMV 草屯番茄分離株；行 4：ToMV 番茄種傳分離株；行 5：山葵-1 分離株；行 6：山葵-4 分離株；行 7：山葵-22 分離株；及行 M：分子量標誌。行 2–4 為 ToMV 分離株可增幅出約 800 bp 的 DNA 產物；行 5–7 為山葵病毒分離株都得到一個 688 bp 的片段。

Fig. 3. Results of RT-PCR using primers of TMVmpf/TMV3nr. Lane 1: Healthy CK; Lane 2: ToMV-pepino; Lane 3: ToMV-Tsaotun tomato; Lane 4: ToMV-tomato seed trans; Lane 5: Wasabi-1; Lane 6: Wasabi-4; Lane 7: Wasabi-22; and Lane M: marker. Lanes 2–4 showed the 800 bp DNA fragments produced by ToMV isolates; and Lanes 5–7 showed the 688 bp DNA fragments produced by viruses of wasabi isolates.

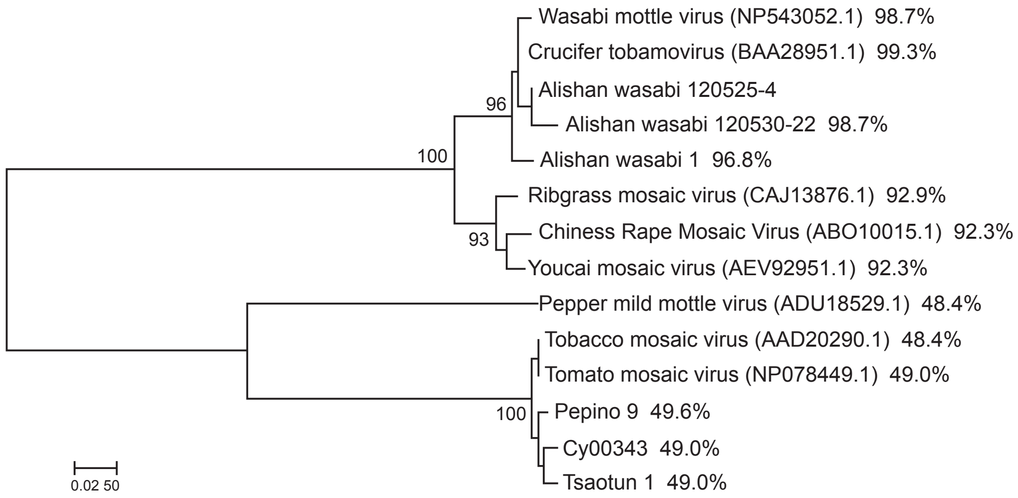


圖 4. 山葵斑駁病毒分離株鞘蛋白基因胺基酸產物以 MEGA4 進行親緣關係分析之樹狀圖。其中包含 Alishan 120525-4 (山葵-4 分離株)、Alishan wasabi 1 (山葵-1 分離株)、Alishan wasabi120530-22 (山葵-22 分離株)、Pepino 9 (ToMV 香瓜茄分離株)、Cy00343 (ToMV 番茄種傳分離株) 及 Tsaotun (ToMV 草屯番茄分離株)。

Fig. 4. Phylogenetic dendrogram of coat protein gene of WMoV isolates (Alishan 120525-4, Alishan wasabi 1, and Alishan wasabi 120530-22) and ToMV isolates (Pepino 9, Cy00343, and Tsaotun). The tree was generated by neighborhood-joining method (MEGA4). The numbers at the nodes indicated the levels of bootstrap support based on a neighborhood-joining bootstrap analysis of 1,000 replications. Bar = 0.025 changes per nucleotide.

strain 部分可能是 WMoV。WMoV 對十字花科植物有專一的病原性，但台灣過去未曾注意山葵的病毒問題，本報告是 WMoV 在台灣的首發紀錄，在公開發表前已以新鑑定的病害項目知會農委會動植物防疫檢疫局，但 WMoV 應在此之前已存在於阿里山區。

引用文獻

Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475–483.

Deng, T. C., Y. T. Lin, C. H. Tsai, J. Y. Liao, Y. H. Cheng, Z. H. Lee, C. C. Shih, and Y. C. Chen. 2012. Identification and occurrence of a *Tomato mosaic virus* infecting pepino (*Solanum muricatum*) plants in Penghu, Taiwan. Plant Prot. Bull. 54:47–64. (in Chinese with English abstract)

Huang, J., C. Deng, Z. Fan, G. Tian, and H. Li. 2004. Isolation and identification of *Tobaco mosaic virus* infecting *Syringa oblate*. Acta Phytopathol. Sin. 34:215–220.

Kashiwazaki, S., K. Shimazu, and T. Tsuchizaki. 1990. Serological properties of wasabi strain of tobacco mosaic virus. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 56:257–260.

Kim, H. M. and K. J. Lee. 1999. Characteristics of tobacco mosaic virus isolated from wasabi (*Eutrema wasabi*) in Korea. Plant Pathol. J. 15:247–250.

Oshima, N., Y. Ohashi, and M. Umekawa. 1971. Studies on some strains of tobacco mosaic virus pathogenic to Crucifer plants I. Physical and chemical studies. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 37:319–325.

Oshima, N., Y. Ohashi, and M. Umekawa. 1974. Studies on some strains of tobacco mosaic virus pathogenic to Crucifer plants 2. Host range. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 40:243–251.

Shimamoto, I., S. Sonoda, P. Vazquez, N. Minaka, and M. Nishiguchi. 1998. Nucleotide sequence analysis of the 3'terminal region of a wasabi strain of crucifer tobamo virus genomic RNA: Subgrouping of crucifertobamo viruses. Arch. Virol. 143:1801–1813.

Takahashi, Y. and K. Shohara. 1990. Practical detection of wasabi strain of tobacco mosaic virus by using cocktail monoclonal antibodies. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 56:621–627.

Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350–4354.

Identification of *Wasabi mottle virus* Infecting Wasabi in Taiwan

Ting-Chin Deng[1,*], Chin-Hui Tsai[2], and Fang-Yu Ning[3]

Abstract

Deng, T. C., C. H. Tsai, and F. Y. Ning. 2016. Identification of *Wasabi mottle virus* infecting wasabi in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 65(1):103–108.

Virus-liked wasabi plant samples were collected in Alishan Township, Chiayi in April 2012. By leaf sap inoculation, local lesions were developed on *Chenopodium quinoa*, from which pure virus isolates were obtained through single lesion isolation. The isolates were crossly reacted with antibody to *Tomato mosaic virus* (ToMV) when tested by enzyme-linked antibody immunoassay (ELISA) or Western blot. Results of inoculation tests showed that the host range was mainly limited in cruciferous plants, except for *Brassica napus* and B. *oleracea* L. var. *capitata* cv. Chu-chiu. Total viral RNA was purified and a pair of *Tobamovirus*-general primers (TMVmpf and TMV3nr) was applied to conduct reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and that resulted in producing a 688 bp DNA fragment. The nucleotide sequence of the fragment (part of the CP gene and part of MP gene) was determined. BLAST analysis of this fragment revealed the virus isolate shared the maximum nucleotide identities (99%) with *Wasabi mottle virus* Tochigi isolate (AB017504). Phylogenetic analysis also showed that the viral CP gene was 99.3% identical to a wasabi strain of crucifer *Tobamovirus* (Acc No. BAA28951), compared with 49% identities to an isolate of ToMV from Queensland, Australia (NP_078449). Therefore, the virus isolates were identified as a *Wasabi mottle virus* (WMoV). However, the virus was detected in 66 out of 187 wasabi plant samples collected in Alishan area and all of these positive samples were further identified as WMoV by nucleic acid analysis. This paper is the first report of WMoV occurred in Taiwan, but WMoV should have been existed in the Alishan area already.

Key words: *Tobamovirus*, Alishan, *Tomato mosaic virus*, Brassicaceae.

Received: June 9, 2015; Accepted: July 10, 2015.
[*] Corresponding author, e-mail: tcde@tari.gov.tw
[1] Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Research Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Assistant Research Fellow, Departments of Tea Agronomy, Tea Research and Extension Station, Taoyuan, Taiwan, ROC.

Editorial Board

Editor-in-Chief

Yang, Chwen-Ming
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Editors

Ann, Pao-Jen
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chi-Chung
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University

Chen, Chien-Chung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chiling
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chung-Li
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Chen, Fure-Chyi
Department of Plant Industry, National Pingtung University of Science and Technology

Chen, Suming
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University

Chien, Li-Hsien
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University

Guo, Horng-Yuh
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute

Hou, Feng-Nan
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Huang, Jenn-Wen
Department of Plant Phathology, National Chung Hsing University

Huang, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Huang, Pung-Ling
Department of Horticulture & Landscape Architecture, National Taiwan University

Kao, Ching Huei
Department of Agronomy, National Taiwan University

Ko, Wen-Hsiung
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Lu, Hsiu-Ying
Miaoli District Agricultural Research and Extension Station

Ou, Shyi-Kuan
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Shen, Yuan
Department of Soil & Environmental Sciences, National Chung Hsing University

Su, Jeng-De
Department of Food Science, Tunghai University

Tsay, Hsin-Sheng
Graduate Institute of Biochemical Sci. & Technol., Chaoyang University of Technology

Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute

Tseng, Menq-Jiau
Department of Horticulture, National Chung Hsing University

Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Wu, Hung-Pan
Institute of Plant & Microbial Biology, Academia Sinica

Editorial Assistants

Chen, Siang-Jiun
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Wang, Li-Jung
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Wu, Yi-Yan
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 65 No. 1 March 30, 2016

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

Publisher	Junne-Jih Chen
Editor-in-Chief	Chwen-Ming Yang
Address	No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 41362, Taiwan, ROC
Website	http://www.tari.gov.tw; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission	http://aspers.airiti.com/JTAR
Press	Airiti Press Inc.
Address	18F., No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 23452, Taiwan, ROC
Tel	+886-2-2926-6006
E-mail	press@airiti.com
Price	NT$ 175 (per copy)
Distributor	1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 10485, Taiwan, ROC GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207 2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 40042, Taiwan, ROC Tel: +886-4-2226-0330